

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**EFEITO DO PROCESSO DE HOMOGENEIZAÇÃO A ULTRA ALTA  
PRESSÃO NA REDUÇÃO DA CARGA MICROBIANA E DA  
ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA ÁGUA DE COCO**

Gustavo Levy Dosualdo  
Engenheiro de Alimentos

Prof. Dr. Marcelo Cristianini  
Orientador

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade  
Estadual de Campinas para a obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos

Campinas-SP

2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

D742e Dosualdo, Gustavo Levy  
Efeito do processo de homogeneização a ultra alta pressão na redução da carga microbiana e da atividade enzimática da água de coco / Gustavo Levy Dosualdo. – Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientador: Marcelo Cristianini  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Homogeneização. 2. Alta pressão (Tecnologia). 3. Água de coco. 4. Enzimas. 5. Microbiologia. I. Cristianini, Marcelo. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

(ckn/fea)

Titulo em ingles: Effect of ultra high pressure homogenization process on the microbial and enzymatic activities of coconut water

Palavras-chave em inglês (Keywords): Homogenization, High pressure (Technology), Coconut water, Enzymes, Microbiology

Titulação: Mestre em Tecnologia de Alimentos

Banca examinadora: Marcelo Cristianini  
Hilary Castle de Menezes  
Flávio Luís Schmidt  
Alfredo de Almeida Vitali

Programa de Pós-Graduação: Programa em Tecnologia de Alimentos

## **BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Marcelo Cristianini  
(orientador)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Hilary Castle de Menezes  
(membro da banca)

---

Prof. Dr. Flávio Luís Schmidt  
(membro da banca)

---

Prof. Dr. Alfredo de Almeida Vitali  
(membro da banca)

Aos meus pais:

Narça e Maria

## **AGRADECIMENTOS**

- Ao Prof. Marcelo Cristianini pela orientação, profissionalismo e companheirismo no trabalho e fora dele.
- Ao Peckolt, grande amigo desde a graduação e por mais muitos anos, pelo companheirismo e pela ajuda durante todo o projeto.
- Ao Mark, por toda a ajuda durante o trabalho e pelas muitas risadas e Mc's.
- À Paty Levy pela ajuda durante os processamentos e análises.
- Aos amigos (técnicos e alunos) dos laboratórios de processos e de micro, sempre prestativos.
- Aos meus pais, Narça e Maria, pelo apoio e incentivo e por tudo que me ensinaram (e continuam ensinando).
- Aos meus irmãos e cunhados, Carol, Lu, Rica e Ana Carol – sempre presentes, bem humorados, prontos para conversar sobre qualquer coisa e para ajudar no que for preciso.
- Aos meus avós, Narciso, Ercênia e Dita, pelo amor e carinho que sempre me dedicaram.
- Aos amigos da graduação, presentes até hoje (Gui, Peck, Jana, Janjão, Mari, Moribe, Bel, Cam, Gu, Ana, Fefa, Fred, Fê Simon, Ro, Flávia, Du, Carol, Leite, Tiaguinho, Jaque, Sorriso, Jana, Xuchu, Mari, Bauru, Thales, Fernandinha, Karina, Bei, Matheus, Júlio, Luizera, etc... etc.. etc...).
- Aos amigos da velha RepTcheca (Didi, Luciano, Kouei, Adriano, Guigo e Daniel) pelas inúmeras risadas e e-mails estranhos.
- À CAPES e à FAPESP pela bolsa de mestrado e pelo financiamento do projeto de pesquisa.

## ÍNDICE

ÍNDICE DE TABELAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
RESUMO	xiii
INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	5
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
ESTUDO 1 – Inativação enzimática em água de coco pelo processamento de Homogeneização a Ultra Alta Pressão	22
1 Introdução	22
2 Objetivos	24
3 Material e Métodos	25
3.1 Equipamento	25
3.2 Água de Coco	25
3.3 Processamento	26
3.4 Avaliação das Atividades Enzimáticas	28
3.5 Análises Físico-Químicas	28
4 Resultados e Discussões	28
5 Conclusões	44
6 Bibliografia	45
ESTUDO 2 – Resistência do <i>Lactobacillus fructivorans</i> ao processo de homogeneização a ultra alta pressão	47
1 Introdução	47
2 Objetivos	49
3 Material e Métodos	50
3.1 Equipamento	50
3.2 Água de Coco	50
3.3 Cultura de Microrganismos	51
3.4 Processamento	52
3.5 Contagem Microbiológica	53
3.6 Análises Físico-Químicas	53
4 Resultados e Discussões	54
5 Conclusões	60
6 Bibliografia	61

ESTUDO 3 - Resistência de <i>Saccaromyces cerevisiae</i> ao processo de homogeneização a ultra alta pressão	62
1 Introdução	62
2 Objetivos	64
3 Material e Métodos	65
3.1 Equipamento	65
3.2 Água de Coco	65
3.3 Cultura de Microrganismos	66
3.4 Processamento	67
3.5 Contagem Microbiológica	68
3.6 Análises Físico-Químicas	68
4 Resultados e Discussões	69
5 Conclusões	73
6 Bibliografia	74
ESTUDO 4 – Estabilidade da água de coco homogeneizada a ultra alta pressão	75
1 Introdução	75
2 Objetivos	79
3 Material e Métodos	80
3.1 Equipamento	80
3.2 Água de Coco	80
3.3 Processamento	81
3.4 Estudo de Estabilidade	82
3.4.1 Contagem Microbiológica.....	82
3.4.2 Análises Físico-Químicas.....	82
3.4.3 Atividades Enzimáticas.....	82
3.4.4 Cor e Turbidez.....	83
3.4.5 Sensorial.....	83
4 Resultados e Discussões	84
5 Conclusões	89
6 Bibliografia	90
CONCLUSÕES GERAIS	92
BIBLIOGRAFIA	94

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Comparativo da resistência à pressão hidrostática entre microrganismos.....	15
Tabela 2 - Comparativo da resistência à pressão de homogeneização entre microrganismos.....	17
Tabela 1.1 – Atividade relativa da polifenoloxidase em função da pressão de processo – média (M), desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) – expressos em %.....	29
Tabela 1.2 – Atividade relativa da peroxidase em função da pressão de processo – média (M), desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) – expressos em %.....	30
Tabela 1.3 – Atividade relativa da PFO após 1, 2 ou 3 processamentos consecutivos utilizando diferentes pressões de processo.....	33
Tabela 1.4 – Atividade relativa da POD após 1, 2 ou 3 processamentos consecutivos utilizando diferentes pressões de processo.....	33
Tabela 1.5 – Valores das variáveis independentes utilizadas no planejamento experimental.....	35
Tabela 1.6 – Resultados dos ensaios realizados na etapa de planejamento experimental.....	36
Tabela 1.7 – Análise dos efeitos da pressão de processo e do pH na atividade relativa da PFO....	37
Tabela 1.8 – Coeficientes do modelo: atividade relativa da PFO em função da pressão e pH.....	38
Tabela 1.9 – Análise de Variância do modelo: atividade relativa da PFO em função da pressão e pH	39
Tabela 1.10 – Análise dos efeitos da pressão de processo e do pH na atividade relativa da POD..	41
Tabela 1.11 – Coeficientes do modelo: atividade relativa da POD em função da pressão e pH.....	42
Tabela 1.12 – Análise de Variância do modelo: atividade relativa da POD em função da pressão e pH	43
Tabela 2.1 – Efeito do processamento a Ultra Alta pPressão na inativação de <i>Lactobacillus fructivorans</i> .....	54
Tabela 2.2 – Valores das variáveis independentes utilizadas no planejamento experimental.....	55
Tabela 2.3 – Resultados dos ensaios realizados na etapa de planejamento experimental.....	55
Tabela 2.4 – Análise dos efeitos da pressão de processo e do pH no número de reduções logarítmicas.....	56
Tabela 2.5 - Coeficientes do modelo: número de reduções logarítmicas em função da pressão e pH	57
Tabela 2.6 – Análise de variância do modelo.....	59
Tabela 3.1 – Efeito do processamento a Ultra Alta Pressão na inativação de <i>Sacharomyces cerevisiae</i> .....	69
Tabela 3.3 – Resultados dos ensaios realizados na etapa de planejamento experimental.....	70
Tabela 4.1 – Resultados das análises microbiológicas dos produtos congelado (CONG), tratado a alta pressão (HUAP) e alta pressão com ácido ascórbico (HUAP+AA).....	84



## INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 – Perfurador de cocos.....	26
Figura 1.2 – Curvas de atividade relativas da POD e PFO em função da pressão de processo .....	31
Figura 1.3 – Atividade relativa de PFO após 1, 2 ou 3 tratamentos consecutivos a 300 Mpa.....	34
Figura 1.4 – Atividade relativa de POD após 1, 2 ou 3 tratamentos consecutivos a 300 Mpa.....	34
Figura 1.5 – Histograma dos efeitos da pressão de processo e pH na atividade relativa da PFO – barras em vermelho indicam efeitos negativos.....	38
Figura 1.6 – Superfície de Resposta: atividade relativa da PFO em função da pressão e pH .....	39
Figura 1.7 – Histograma dos efeitos da pressão de processo e pH na atividade relativa da POD – barras em vermelho indicam efeitos negativos.....	41
Figura 1.8 – Superfície de Resposta: atividade relativa da POD em função da pressão e pH.....	42
Figura 2.1 – Modelo de curva de inativação do <i>Lactobacillus fructivorans</i> em função da pressão de processo (relativa ao ensaio 1).....	54
Figura 2.2 – Gráfico de Pareto dos efeitos de P e pH no número de reduções logarítmicas de <i>Lactobacillus fructivorans</i> .....	57
Figura 2.3 – Superfície de resposta: número de reduções logarítmicas em função do pH do produto e da pressão de processo.....	58
Figura 2.4 – Valores previstos e observados do número de reduções logarítmicas das células de <i>Lactobacillus fructivorans</i> .....	59
Figura 3.1 – Modelo de curva de inativação da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em função da pressão de processo (relativo ao ensaio 2).....	70
Figura 4.1 – Resultados das análises físico-químicas.....	85
Figura 4.2 – Resultados das Análises de Atividades Enzimáticas.....	86
Figura 4.3 – Resultados das Análises Instrumentais de Cor e Turbidez.....	88
Figura 4.4 – Resultados das Análises Sensoriais.....	88

## RESUMO

Diferentes tratamentos não térmicos têm sido estudados nos últimos anos como métodos substitutos ou complementares dos tradicionais tratamentos térmicos na conservação de alimentos. Estes tratamentos apresentam a vantagem de não causar alterações indesejáveis no sabor dos produtos ou perdas de nutrientes.

Dentre os tratamentos não térmicos, um dos mais estudados é o processamento a alta pressão, que pode ser aplicado através de dois métodos: o isostático e o de homogeneização. O método isostático tem sido estudado com maior frequência, no entanto, o método de homogeneização apresenta a vantagem de proporcionar uma produção contínua.

Este trabalho visou avaliar o tratamento de homogeneização de alta pressão aplicado à água de coco para eliminação da atividade enzimática e de possíveis contaminações microbiológicas do produto.

Os processamentos de Homogeneização a Ultra Alta Pressão (HUAP) foram realizados no equipamento nG7400H:320, fabricado pela Stansted Fluid Power (Stansted, Inglaterra), que atinge pressões de até 320 MPa. Estudou-se a influência da pressão de processo e do pH do produto nas atividades enzimáticas de peroxidase e polifenoloxidase e na destruição da bactéria *Lactobacillus fructivorans* e da levedura *Saccaromyces cerevisiae*.

Os tratamentos realizados não causaram inativação satisfatória das enzimas presentes na água de coco, porém há evidências de que o tratamento pode ser eficaz se for efetuado em pressões mais elevadas. De maneira geral, a peroxidase apresentou maior resistência ao tratamento do que a polifenoloxidase.

A realização de três tratamentos seqüenciais a 300 MPa causou redução parcial da atividade das enzimas, embora não tenha sido verificada uma potencialização do efeito dos tratamentos HUAP quando realizados seqüencialmente.

O tratamento mostrou-se eficaz na eliminação de contaminação microbiológica do produto. Para o *Lactobacillus fructivorans*, a aplicação de tratamentos em pressões maiores que 250 MPa eliminou totalmente a carga de microrganismos inoculada no

produto, de  $2,0 \times 10^7$  UFC/mL. O pH do produto exerceu uma influência muito menor na eliminação dos microrganismos do que a pressão de processo. Em altas pressões (próximas a 300 MPa), o processamento mostrou-se mais efetivo na destruição do *Lactobacillus fructivorans* quando utilizado em produtos com pH mais elevado. Para baixas pressões, o efeito foi inverso, ou seja, tratamentos em produtos com pHs mais ácidos causaram maior inativação.

Para as leveduras (*Saccaromyces cerevisiae*), a aplicação de tratamentos a pressões acima de 200 MPa eliminou totalmente a carga microbiana inoculada na água de coco, que era de  $4,4 \times 10^5$  UFC/mL. O estudo da influência do pH não apresentou resultados conclusivos porque a maioria dos tratamentos realizados nesta parte do estudo eliminou todas as células de microrganismos presentes no produto, o que dificultou a análise dos dados. Observou-se uma tendência de que valores menores do pH do produto possam favorecer a eliminação das células das leveduras durante o processamento

Nas condições estudadas pode-se concluir que o tratamento de homogeneização a alta pressão foi eficiente na eliminação dos microrganismos estudados mas não foi eficiente para causar a inativação das enzimas presentes no produto (peroxidase e polifenoloxidase). Com isto, espera-se que a água de coco tratada pelo método HUAP apresente boa estabilidade microbiológica, mas não apresente boa estabilidade química, ficando sujeita a alterações devido a reações catalisadas por estas enzimas.



## INTRODUÇÃO

O estudo da ciência e da tecnologia de alimentos tem como principal objetivo a diminuição das perdas dos alimentos produzidos e manutenção das suas características nutritivas e funcionais. A cada ano, milhares de toneladas de alimentos são desperdiçados e jogados no lixo devido a processos químicos ou biológicos que ocorrem naturalmente nos alimentos quando estes não são tratados e ou conservados de maneira adequada.

Vários processos para conservar os alimentos e disponibiliza-los para consumo por um maior período de tempo foram surgindo através dos anos. O uso de processos físicos e químicos tornou-se muito comum no preparo e na conservação dos alimentos.

O uso do calor é um dos meios mais utilizados para se obter uma maior estabilidade para produtos alimentícios. O calor é capaz de eliminar microrganismos e de inativar enzimas que aceleram reações bioquímicas e fazem com que o alimento se deteriore mais rapidamente, tornando-se inadequado para o consumo.

No entanto, ao mesmo tempo em que traz os benefícios da destruição de microrganismos e enzimas, o calor causa outras alterações, químicas e físicas, nos alimentos, fazendo com que as suas características sensoriais e nutricionais também se alterem.

Estas alterações sensoriais podem ser desejáveis, como no caso do fornecimento de pães, ou do cozimento da carne, ou indesejáveis, como por exemplo no caso da pasteurização de sucos de frutas.

Nos últimos anos, tem-se notado uma tendência do consumo de produtos com características sensoriais mais próximas possíveis às dos produtos naturais e também ao consumo de produtos com boas propriedades nutricionais, ricos em vitaminas e outros ingredientes funcionais.

Como o tratamento térmico causa alterações no sabor dos produtos e perdas de vitaminas e outros nutrientes, diversos estudos têm sido levados adiante pela comunidade científica buscando alternativas aos tratamentos térmicos tradicionais na conservação dos

produtos alimentícios, principalmente no que diz respeito à destruição de microrganismos e à inativação enzimática.

Como exemplos de tratamentos que têm sido estudados como alternativa aos tratamentos térmicos tradicionais, podemos citar a radiação, o pulso elétrico, o aquecimento ôhmico, e os tratamentos de alta pressão (isostático ou de homogeneização).

Estes tratamentos geralmente causam apenas pequenas alterações nas características naturais dos produtos, e têm as mesmas funções de conservação dos tratamentos térmicos comumente usados. Desta forma, um novo leque de possibilidades é aberto para o mercado de alimentos e bebidas. Estas novas tecnologias permitem melhorar a qualidade dos alimentos que são atualmente conservados pelo uso de tratamentos térmicos, além de possibilitar aumento de sua estabilidade e permitir o desenvolvimento de novos produtos, que não são compatíveis com os tratamentos térmicos tradicionais.

O tratamento de homogeneização a ultra alta pressão (HUAP), é aplicável a qualquer tipo de bebida ou alimento fluido, como leites, sucos de frutas, geléias, pastas, etc. O processo HUAP é uma variação do método de homogeneização, altamente difundido na indústria de laticínios, utilizado para romper os glóbulos de gordura do leite. As pressões utilizadas, no entanto, são bastante superiores às utilizadas no processo de homogeneização do leite, o que faz com que ocorra o rompimento de células de microrganismos, além de alterações em macro moléculas dos alimentos, como é o caso das proteínas (incluindo-se aí, as enzimas).

O processo HUAP, no entanto, não causa alteração em moléculas menores presentes nos alimentos, como é o caso da maior parte dos compostos responsáveis pelas propriedades sensoriais e pelas características nutricionais dos alimentos.

Desta forma, o estudo deste processo torna-se bastante interessante para aplicação em produtos líquidos que precisam ter suas características mantidas por um período prolongado de tempo, mas não podem perder suas propriedades nutricionais ou funcionais, e tampouco ter suas características sensoriais alteradas.

Os produtos que mais se encaixam nestas características são os produtos derivados de frutas, como sucos, pastas e geléias. Estes produtos têm suas características sensoriais facilmente alteradas pelo processamento térmico, devido principalmente a

reações de caramelização que ocorrem devido à presença de açúcares em suas composições.

A água de coco é uma bebida proveniente do endosperma do coco, que ultimamente tem sido muito utilizada por esportistas devido às suas propriedades de isotonicidade, permitindo rápida absorção e re-hidratação do organismo. Devido ao seu sabor bastante apreciado, também tem tido um mercado cada vez maior para o público em geral.

A industrialização da água de coco atualmente é feita através de processamentos térmicos, uso de aditivos químicos e uso de refrigeração ou congelamento.

Todos os processos utilizados atualmente apresentam inconveniências que poderiam ser evitadas pela utilização desta nova tecnologia. O processamento térmico causa alterações sensoriais ao produto que são indesejáveis; o uso de aditivos químicos como conservantes também é inadequado, principalmente tratando-se de um produto com forte apelo natural e de saúde; por fim, o uso de resfriamento ou congelamento depende de uma grande infra-estrutura e de toda uma cadeia de transporte e armazenamento, o que eleva substancialmente os preços ao consumidor.

Os estudos já realizados dos processamentos a alta pressão indicam que há possibilidade de eliminação de microrganismos e enzimas que causam a deterioração da água de coco, permitindo um aumento de sua estabilidade com menores alterações sensoriais. No entanto, o uso de resfriamento não pode ser evitado pelo uso da tecnologia HUAP devido à baixa eficiência deste processo na eliminação de esporos bacterianos.

Desta forma, a idéia seria de um produto processado através do tratamento HUAP, que eliminaria células vegetativas de microrganismos e a atividade enzimática, e conservado sob temperatura de refrigeração, o que evitaria uma possível germinação de esporos e desenvolvimento de bactérias no produto.

Com isto, a seqüência do processo de produção seria: higienização dos frutos, extração da água, padronização da água (sólidos solúveis, pH, temperatura), homogeneização (HUAP), resfriamento, envase asséptico e conservação à temperatura de refrigeração.

No capítulo de revisão bibliográfica, serão mencionados os diferentes estudos já realizados por processos a alta pressão isostática ou de homogeneização, além de uma descrição mais detalhada dos processos. A água de coco também será descrita com maiores detalhes.

Esta dissertação de mestrado foi escrita na forma de artigos, num total de quatro, cada um em um capítulo. Para cada artigo, foram seguidas as normas de publicação (vigentes em janeiro de 2003) da revista Ciência e Tecnologia de Alimentos, publicada pela Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos – SBCTA, que são as mesmas seguidas pelo Journal of Food Science, publicado pelo Institute of Food Technologists – I.F.T.

Cada capítulo trata de uma etapa do projeto de pesquisa. Os três primeiros tratam da resistência de diferentes agentes deterioradores da água de coco ao tratamento HUAP. Os estudos de resistência foram realizados com enzimas – polifenoloxidase e peroxidase (Capítulo 1), bactérias – *Lactobacillus fructivorans* (Capítulo 2) e leveduras – *Saccaromyces cerevisiae* (Capítulo 3). O quarto capítulo apresenta os resultados do teste de estabilidade da água de coco homogeneizada a ultra alta pressão e armazenada por 1 mês, a 10°C.



## OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivo a avaliação do tratamento de homogeneização de ultra alta pressão aplicado à água de coco.

Para isto, avaliou-se a influência deste tratamento na atividade das duas enzimas presentes na água de coco e na eliminação de dois possíveis microrganismos contaminantes do produto, sendo uma levedura e uma bactéria. As duas enzimas estudadas foram a peroxidase e a polifenoloxidase e os microrganismos foram os das espécies *Sacharomyces cerevisiae* e *Lactobacillus fructivorans*.

Em cada estudo, avaliou-se isoladamente a influência de tratamentos a diferentes pressões de processo e, em seguida, a influência da pressão de processo aliada à variação do pH do produto.

Para a inativação enzimática, também foi realizado um estudo que avaliou o processamento através de tratamentos múltiplos (até três ciclos consecutivos através do sistema) para verificar se há uma potencialização do efeito de inativação das enzimas.

Por último, foi realizado um estudo de estabilidade do produto processado a alta pressão e armazenado em garrafas de vidro de 450mL, a temperatura de refrigeração (10°C), comparado a um produto não processado e armazenado sob congelamento no mesmo tipo de embalagem.

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### Tratamentos não-térmicos

A tendência de preferência do consumidor é em direção a produtos naturais e saudáveis, e cada vez menos alimentos processados. Em sucos de frutas e vegetais a tendência é na direção de sucos recém extraídos, com gosto fresco e integridade de sabor e vitaminas, o mais próximo possível dos sucos feitos em casa (BIGNON, 1997).

O consumidor cada vez mais busca alimentos que tenham estabilidade prolongada, mas que não utilizem aditivos químicos, e que apresentem características organolépticas próximas à dos produtos naturais (não processados), e com funções nutricionais e até nutracêuticas (ou funcionais). Com isto, os tratamentos térmicos podem perder espaço para tratamentos que promovem menores alterações organolépticas ou nutricionais aos produtos, já que o uso de altas temperaturas geralmente causa reações indesejadas nos alimentos, como alterações sensoriais e perda de características funcionais e nutritivas.

A maior parte das técnicas de preservação de alimentos atua primeiramente diminuindo, ou até, inibindo completamente as alterações causadas por microrganismos no produto. Buscando atender as carências dos consumidores, novas técnicas buscam métodos mais naturais (por exemplo uso da atmosfera modificada, culturas protetoras, bacteriocinas, e outras enzimas). Em contraste às técnicas inibitórias, uma das técnicas mais utilizadas atua na inativação dos microrganismos alvo, sendo que a única técnica substancialmente usada atualmente para este propósito (de inativação, ao invés de inibição de crescimento) seja o uso do calor. Entretanto, a maior parte das técnicas emergentes atua através de inativação direta, como por exemplo, a irradiação, aplicação de altas pressões, descargas elétricas de alta voltagem, ultra-som ou adição de enzimas, como lisozimas (GOULD, 1996).

Os tratamentos não térmicos que vêm sendo estudados buscam aumentar a estabilidade dos produtos, sem causar as reações indesejadas que podem ocorrer no caso dos tratamentos térmicos. Desta forma, são esperadas alterações mínimas no teor de nutrientes e vitaminas e alterações sensoriais mínimas ou imperceptíveis.

## **O Processamento a Alta Pressão**

Uma das tecnologias mais inovadoras para processar produtos termosensíveis é o tratamento de pressão, que utiliza pressões extremamente altas para provocar destruição microbológica e retardar significativamente as taxas de reações enzimáticas. Assim, o processamento a alta pressão oferece uma alternativa para a preservação de sucos de frutas sem alterações sensoriais indesejadas, comumente associadas aos tratamentos térmicos (BASAK & RAMASWAMY, 1996).

O tratamento a alta pressão foi conhecido como uma técnica potencial de preservação há aproximadamente um século desde os trabalhos de HITE em 1889, que demonstraram que a deterioração do leite podia ser retardada pela aplicação de alta pressão (SMELT, 1998). Hite e Bridgman foram os primeiros a relatar a aplicação de alta pressão hidrostática em materiais biológicos. Em 1899, HITE et al. expuseram diversos alimentos e bebidas a altas pressões, de até 680 MPa; em 1914, BRIDGMAN coagulou clara de ovo sob pressão (TAUSCHER, 1994).

A alta pressão foi aplicada por muitos anos na produção de cerâmicas, materiais compostos, diamante artificial e plásticos. Esses desenvolvimentos tecnológicos aumentaram as possibilidades de aplicação comercial na área alimentícia. Uma grande variedade de produtos tratados por pressão foi elaborada no mercado japonês por muitos anos, incluindo preparados de frutas, bolinhos de arroz e lula crua. Na França, sucos de frutas tratados por pressão estão disponíveis. No mercado inglês já existe leite pasteurizado por pressão (SMELT, 1998). Recentemente uma guacamole tratada por pressão foi lançada com sucesso no mercado americano pela empresa Avomex. A empresa tem usado um sistema chamado Quintus 50L fabricado pela ABB Autoclave Systems (MERMELSTEIN, 1999).

O tratamento a alta pressão causa a inativação de microrganismos e enzimas, sem no entanto afetar moléculas pequenas, como a maioria das vitaminas e os compostos voláteis, que conferem aroma e sabor aos alimentos. (SMELT, 1998).

Com isto, a tecnologia de alta pressão tem a vantagem de não alterar significativamente as características sensoriais ou os teores de nutrientes dos produtos quando comparada, por exemplo, à pasteurização térmica tradicional.

O tratamento à pressão ainda tem custo elevado, principalmente porque o investimento inicial é dispendioso, o que limita a sua aplicação a produtos de alto valor agregado. Entretanto, espera-se que estes custos decresçam, com um futuro progresso tecnológico (SMELT, 1998).

O custo do processo a alta pressão varia dependendo do equipamento, volume e nível de utilização. A capacidade de produção típica para o processo em batelada (isostático) varia de 20 mil a 100 mil litros por dia. Assumindo um preenchimento de 75% da câmara de pressão, o custo de produção estimado para sucos, em equipamento de alta produção é aproximadamente US\$0,05 por litro, custo justificável pelos benefícios de qualidade, segurança, e aumento da estabilidade (MERMELSTEIN, 1999).

### **Métodos de Aplicação do Processo**

Dois métodos podem ser utilizados para a pasteurização por alta pressão: no primeiro o produto é pasteurizado já dentro da embalagem final (método de alta pressão isostática), no segundo, o produto é pasteurizado de forma contínua e depois acondicionado assepticamente (método de homogeneização de alta pressão). Estes dois métodos estão sendo pesquisados por um grande número de fabricantes de equipamentos, universidades e institutos de pesquisas.

Romeo Toledo, professor de Ciência de Alimentos na Universidade da Geórgia, tem estudado o uso da alta pressão na pasteurização de suco de laranja e outros líquidos em uma base contínua, usando um método de processamento de alta pressão (homogeneização) que foi caracterizado como o método da descarga, tendo aplicado uma patente no processo (MERMELSTEIN, 1999). O processo utiliza fundamentalmente um homogeneizador de alta pressão com o intuito de romper as células de microrganismos, princípio largamente utilizado nas aplicações de biotecnologia.

O processo de fluxo contínuo de Toledo (apud MERMELSTEIN, 1999) é uma variação de um processo de homogeneização (muito usado na indústria de laticínios) que usa uma pressão muito alta. Dois intensificadores de pressão em pistões trabalham alternadamente, produzindo pressões no produto de até 310 MPa. A pressão é então reduzida repentinamente até a pressão atmosférica através de uma válvula de homogeneização. Isto produz uma velocidade muita elevada através do orifício, e a expansão resultante é responsável pela ruptura das células de microrganismos, não

afetando as células do alimento e compostos responsáveis pelo sabor e pelas características nutricionais e funcionais dos alimentos. O suco é refrigerado imediatamente até 20°C e acondicionado. (MERMELSTEIN, 1999).

A pressão só é aplicada ao produto entre o intensificador de pressão e a válvula de homogeneização, o que significa um período de tempo da ordem de alguns milésimos de segundo.

Ao passar pela válvula de homogeneização, a velocidade do produto torna-se extremamente alta (podendo alcançar velocidades acima da velocidade do som) e a pressão extremamente baixa, causando a evaporação do fluido, e começando o fenômeno de cavitação (POPPER & KNORR, 1990). Neste momento ocorre a ruptura das células de microrganismos.

Observou-se que a elevação prevista da temperatura na homogeneização a 103 MPa foi de 24°C, e que com temperatura de entrada de 4°C, a temperatura do produto não excederia 28°C, muito abaixo das temperaturas para inativação térmica dos microrganismos (MERMELSTEIN, 1999).

Toledo alcançou reduções de 5 ciclos logarítmicos em microrganismos relevantes para o processamento de alimentos utilizando pressões de aproximadamente 200 MPa (MERMELSTEIN, 1999).

Um outro enfoque para a pasteurização a alta pressão é o uso de isostáticos, ou de pressão hidrostática. Várias empresas fabricam tanto o sistema por batelada como o sistema semicontínuo, que estão sendo usados por empresas e universidades do setor de alimentos (MERMELSTEIN, 1999).

A empresa ABB, está promovendo o uso de seu equipamento isostático de batelada para processar embalagens de consumo direto dos sucos, que envolve processar o produto contido já dentro da embalagem final de consumo. Este equipamento é utilizado para a produção de guacamole para o mercado americano. A produção é de aproximadamente 90 toneladas por mês. A ABB diz que muitos produtores de suco vêm com otimismo a idéia de processar a embalagem para consumo direto, pois o produto é imediatamente encaminhado para a distribuição após o processamento. O enchimento

asséptico é eliminado, e a facilidade de alternar a produção entre diferentes sucos em etapas curtas é um fator positivo a mais (MERMELSTEIN, 1999).

No processo de batelada para sucos, o produto é envasado em garrafas ou em bolsas plásticas termoseladas à vácuo, carregadas nas cestas e transferidas para a câmara de pressão. Pressão de 500 a 600 MPa normalmente é aplicada de 1 a 2 minutos com o produto refrigerado de 4 a 10°C. A necessidade de envase asséptico é eliminada, já que o suco e as bolsas são tratados simultaneamente com a alta pressão. A possibilidade de contaminação cruzada é quase nula (MERMELSTEIN, 1999).

Na pasteurização por alta pressão (método isostático) o produto é submetido a uma pressão muito alta durante poucos segundos. Este processo leva à destruição de bactérias, leveduras e fungos, e a uma parcial desnaturação de enzimas. O princípio da eliminação dos microrganismos é a destruição de membranas das células pela alta pressão. Reduções de  $10^3$  até  $10^6$  CFU/g podem ser alcançadas utilizando-se o processo isostático a 410 MPa por 2 minutos, dependendo da natureza do microrganismo. Leveduras são particularmente sensíveis a esse tratamento. Esses resultados são compatíveis com os objetivos da pasteurização para sucos de frutas (BIGNON, 1997).

WUYTACK et al. (2002) realizaram um estudo comparativo dos métodos isostático e de homogeneização e concluíram que o mecanismo de inativação de microrganismos é diferente em cada um dos métodos. As espécies mais resistentes ao tratamento isostático não são necessariamente as mais resistentes ao tratamento de homogeneização. Além disso, não foram observadas células com injúrias subletais no tratamento de homogeneização, diferentemente do que ocorre no tratamento isostático.

Segundo WUYTACK et al. (2002), o processo de homogeneização elimina as células vegetativas principalmente através da destruição mecânica da integridade das células, enquanto o processo isostático interfere em diversas estruturas celulares, como a membrana citoplasmática, ribossomos e algumas enzimas.

### **Utilização do Processo na Industrialização da Água de Coco**

Os cocos, após serem removidos das árvores, podem ser mantidos por até quinze dias em temperatura ambiente sem haver deterioração. Depois disto, o produto se torna impróprio para consumo devido à fermentação. Porém, quando a água é retirada do fruto,

ela se deteriora em apenas um dia devido à contaminação externa por microrganismos. REDDY et al. (2005) reportou contaminações de até  $10^6$  UFC/mL no método tradicional de extração da água.

Atualmente, a água de coco envasada pode ser encontrada nas seguintes formas: pasteurizada e congelada, pasteurizada e adicionada de aditivos químicos (refrigerada) ou esterilizada.

No processamento da água de coco congelada, o produto é extraído, pasteurizado, envasado e congelado. Através deste processo pode-se obter um produto estável por até 4 meses, porém, o produto deve ser mantido a  $-18^{\circ}\text{C}$ , havendo necessidade de um rígido controle da cadeia de frio, além de haver um alto custo para manter o produto a esta temperatura. Depois de descongelado, o produto mantém suas características por até três dias se conservado a  $5^{\circ}\text{C}$ . A água de coco distribuída sob refrigeração, além dos aditivos químicos, o produto sofre processamento térmico. O produto apresenta-se estável por até 6 meses.

No caso da água de coco esterilizada, após a extração, a água é submetida a tratamento térmico a temperatura ultra-alta (UHT), seguido de envase asséptico em embalagens cartonadas, sendo mantido a temperatura ambiente. Neste caso, há um alto gasto de energia para a realização do processo UHT. No entanto, através deste processo pode-se aumentar a estabilidade do produto para até oito meses, sem a necessidade de refrigeração.

Para a água de coco maduro, nota-se uma tendência do mercado pela utilização do processo UHT e envase em embalagens cartonadas. Para a água de coco verde, o processo de esterilização é pouco utilizado.

Os três processos visam eliminar os fatores que podem causar deterioração e conseqüente diminuição da estabilidade, ou seja, a atividade enzimática e a carga microbiológica.

Como a esterilização térmica afeta consideravelmente o sabor do produto, vários tratamentos, tais como filtração, pasteurização, pH e sólidos solúveis, concentração por osmose reversa, adição de conservantes, carbonatação, etc., em várias combinações, têm

sido testados para a preservação da água de coco (BERGONIA et al., 1982; DEL ROSARIO et al., 1986; MAGDA, 1992). Na maior parte deles, houve alteração no sabor da bebida.

REDDY et al. (2005) conseguiram obter água de coco estéril em escala laboratorial sem afetar o sabor do produto, através de um sistema de filtração sob pressão. Embora tenha conseguido obter um produto estéril, não foram avaliadas as atividades enzimáticas na bebida após a filtração e o processo de obtenção da água de coco estéril era muito lento.

A conservação da água de coco através do tratamento a alta pressão pode ser vantajosa, pois pode ser possível eliminar microrganismos e diminuir a atividade enzimática do produto através deste processo, sem alterar as suas características nutricionais ou organolépticas. Com isto, deve-se obter um produto com características nutritivas, funcionais e sensoriais mais próximas às naturais, quando comparado ao produto tratado termicamente.

### **Inativação de Microrganismos Utilizando Alta Pressão**

A água de coco é uma solução naturalmente estéril, porém, suscetível de ser contaminada no processo de extração por microrganismos que podem se desenvolver facilmente neste meio, que dispõe de água, açúcares e proteína em quantidade suficiente para isto. Por ser um bom meio para o crescimento de microrganismos, a água de coco chega a ser usada em laboratórios de análises microbiológicas como meio de cultura.

A contaminação do produto pode ocorrer pelo contato com ambiente, equipamentos ou manipuladores, ou ainda pela presença de frutos doentes ou rachados. Sendo assim, os principais microrganismos que podem contaminar o produto são bolores, leveduras e bactérias presentes no ambiente de produção. A eficácia do tratamento de alta pressão para eliminação de alguns microrganismos que poderiam estar presentes na água de coco industrializada já foi comprovada por alguns estudos feitos com outros produtos.

BARBOSA-CANOVAS (1997) mostra a viabilidade da aplicação de alta pressão para a eliminação de diversos microrganismos. *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Sacharomyces cerevisiae*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus aureus*, *Streptococcus lactis*, *Vibrio cholera*, entre outros, sofreram reduções logarítmicas quando submetidos ao tratamento de alta pressão, com pressões, temperaturas e tempos variados, havendo esterilização em alguns casos.



Através do método isostático, pressões entre 300 e 600 MPa podem inativar leveduras, mofos e a maioria das células vegetativas de bactérias incluindo a maioria dos patógenos infecciosos presentes nos alimentos. Assim, o uso da pressão é uma alternativa potencial à pasteurização por aquecimento, pois a pressão mantém as moléculas pequenas, assim como muitos compostos de sabor e as vitaminas, intactos. Em geral, os esporos de bactérias só podem ser eliminados por pressões muito altas (maiores que 1000 MPa). Alguns esporos de bactérias, entretanto, podem ser estimulados a germinar em pressões de 50 a 300 MPa. Os esporos germinados podem ser eliminados por relativo tratamento térmico médio ou tratamento médio sob pressão. Porém, geralmente uma pequena fração de esporos sobrevive a este tratamento. Conseqüentemente, esta ainda não é uma aplicação prática do tratamento como processo de esterilização, mas ainda é uma área interessante para futura exploração (SMELT, 1998).

Os esporos de fungos e leveduras geralmente são inativados por pressões próximas a 400 MPa. No entanto, há esporos bacterianos que resistem a pressões maiores que 1000 MPa (SMELT, 1998).

No processo hidrostático, com pressões superiores a 200 MPa, a taxa de destruição aumenta com o aumento da pressão ou do tempo de processo. (CHEFTEL, 1995). A aplicação de pressões maiores que 600 MPa, provavelmente reduziria o tempo de inativação de fungos, leveduras e bactérias no estado vegetativo.

Em geral, o dano nos microrganismos pela aplicação da alta pressão se dá, primeiramente, na parede celular (HOOVER et al., 1989).

Segundo SMELT (1998), os microrganismos mais resistentes aos tratamentos térmicos, em geral, também são mais resistentes ao tratamento sob alta pressão, embora haja exceções. As bactérias Gram-positivas apresentam maior resistência do que as Gram-negativas. A rigidez da parede celular das Gram-negativas confere uma fragilidade à estrutura. Além disso, a parede celular é mais fina (possuem membrana externa) se comparada com a de uma Gram-positiva.

GOULD (1996) cita que, com respeito à sensibilidade à pressão dos microrganismos, uma divisão importante é aquela entre as formas vegetativa e esporulada das bactérias. Enquanto inúmeros fatores ambientais afetam a tolerância à pressão, em particular a atividade de água, geralmente as formas vegetativas ainda mantidas são

inativadas por pressões na região de 300 a 500 MPa, mas esporos de várias espécies resistem bem a pressões de até 1000 MPa (método isostático). Por esta razão, a aplicação mais comum da tecnologia de alta pressão na preservação de alimentos é em alimentos de baixo pH ou refrigerados, nos quais esporos não são um problema porque, mesmo que sobrevivam, estarão incapacitados de crescer (GOULD, 1996).

A fase de crescimento da cultura também influencia a resistência das células ao tratamento. Bactérias no início da fase log são normalmente mais sensíveis à pressão do que as células nas fases estacionária, lag ou de morte (ZOBELL apud HOOVER et al., 1989).

Os princípios de destruição dos microrganismos não estão bem elucidados para nenhum dos dois métodos de aplicação do tratamento de alta pressão. Geralmente, os pesquisadores associam a morte dos microrganismos com alterações da estrutura da membrana celular (ou até com o seu rompimento) e com alterações de proteínas importantes para o metabolismo ou reprodução das células.

Para o método isostático, BIGNON (1997) cita como princípio de eliminação dos microrganismos a destruição de membranas das células pela alta pressão. HOOVER et al. (1989) constata que a pressão causa algumas desnaturações protéicas na membrana, modificando a permeabilidade e a seletividade da membrana plasmática, podendo resultar na morte da célula.

Várias mudanças morfológicas são observadas com o aumento da pressão: compressão de vacúolos gasosos, alongamento da célula, separação da membrana da parede celular, contração da parede celular com a formação de poros, modificações no citoesqueleto, modificações no núcleo e em organelas intracelulares (acima 400 MPa, no caso de *Sacharomyces*), coagulação de proteínas citoplasmáticas, liberação de constituintes intracelulares (especialmente os de origem nuclear) para fora da célula, entre outros (SHIMADA et al. apud CHEFTEL, 1995).

PARISH (1998) utilizou parâmetros de inativação microbiológica relacionados ao tratamento hidrostático análogos àqueles utilizados em termobacteriologia: D é tempo de tratamento, a uma determinada pressão, necessário para reduzir em um ciclo logarítmico uma população de microrganismos; z é o aumento na pressão de tratamento necessário para reduzir em um ciclo logarítmico o valor de D.

A Tabela 1 apresenta uma comparação da resistência à pressão hidrostática de alguns microrganismos de interesse em alimentos:

**Tabela 1 - Comparativo da resistência à pressão hidrostática entre microrganismos.**

Microrganismo	Pressão (MPa)	D (min)	T (°C)	Substrato	Referência
<i>Clostridium pasteurianum</i>	700	2,4	60 °C	n.i.	Maggi et al.,1995
<i>Clostridium pasteurianum</i>	800	3,4	60 °C	n.i.	Maggi et al.,1995
<i>Citrobacter freundii</i>	230	14,7	20 °C	n.i.	Charles et al.,1992a
<i>Listeria monocytogenes</i> <sup>1</sup>	414	2,17	25 °C	n.i.	Ananth et al.,1998
<i>Salmonella senftenberg</i>	414	1,48	2 °C	n.i.	Ananth et al.,1998
<i>Listeria innocua</i> <sup>2</sup>	400	3,12	2 °C	n.i.	Gervilla et al.,1997
<i>Listeria innocua</i> <sup>2</sup>	400	4	25 °C	n.i.	Gervilla et al.,1997
<i>Staphylococcus aureus</i> <sup>3</sup>	200	211,8	20 °C	n.i.	Erkmen et al.,1997
<i>Staphylococcus aureus</i> <sup>3</sup>	250	15	20 °C	n.i.	Erkmen et al.,1997
<i>Staphylococcus aureus</i> <sup>3</sup>	300	3,7	20 °C	n.i.	Erkmen et al.,1997
<i>Staphylococcus aureus</i> <sup>3</sup>	350	2,6	20 °C	n.i.	Erkmen et al.,1997
<i>Listeria innocua</i>	400	7,35	2 °C	n.i.	Ponce et al.,1998
<i>Listeria innocua</i>	400	8,23	20 °C	n.i.	Ponce et al.,1998
<i>Listeria monocytogenes</i> <sup>1</sup>	150	84,4	4 °C	leite cru	Mussa et al.,1999
<i>Listeria monocytogenes</i> <sup>1</sup>	250	46,0	4 °C	leite cru	Mussa et al.,1999
<i>Listeria monocytogenes</i> <sup>1</sup>	300	26,6	4 °C	leite cru	Mussa et al.,1999
<i>Listeria monocytogenes</i> <sup>1</sup>	350	13,9	4 °C	leite cru	Mussa et al.,1999
<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	500	0,02*	n.i.	suco de laranja	Parish, 1998a
<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	350	0,64*	n.i.	suco de laranja	Parish, 1998a
<i>Sacharomyces cerevisiae</i> <sup>4</sup>	500	0,07**	n.i.	suco de laranja	Parish, 1998a
<i>Sacharomyces cerevisiae</i> <sup>4</sup>	350	1,27**	n.i.	suco de laranja	Parish, 1998a
<sup>1</sup> Scott A	<sup>4</sup> ascoporos			n.i.: não informado	
<sup>2</sup> 910 CECT	* z = 106 MPa			<sup>a</sup> apud Tewari et al., 1999	
<sup>3</sup> ATCC 27690	** z = 123 MPa				

LEE et al. (2002) utilizou uma combinação de alta pressão isostática (até 621 MPa) e temperatura (45, 71 ou 90°C) para eliminar a contaminação de esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* em suco de maçã, obtendo mais de 5 reduções logarítmicas na contagem de esporos em diversas combinações de pressão e temperatura.

Já no método de homogeneização, a morte dos microrganismos geralmente é associada ao rompimento das células ao passar pela válvula de homogeneização, onde elas são submetidas a diversas forças que podem causar seu rompimento.

POPPER & KNORR (1990), propõem que os microrganismos são destruídos pela repentina queda de pressão, tensão de cisalhamento e torção, e mais provavelmente devido às ondas de choques de cavitação resultantes do colapso das bolhas de gás.

A elevada velocidade alcançada pelo produto ao passar através da válvula de homogeneização é responsável pelo atrito entre as células de microrganismos, o que pode causar o colapso da parede celular devido à sua rigidez. Ao passar pela válvula de homogeneização o produto encontra um ambiente de pressão muito baixa que proporciona a expansão do líquido e conseqüente colapso dos vacúolos de gás das células dos microrganismos (POPPER & KNORR, 1990).

Vários mecanismos de ruptura das células já foram propostos, incluindo turbulência, cavitação, impacto em superfícies sólidas e cisalhamento. Estudos recentes evidenciam que a cavitação e o cisalhamento são os mecanismos primários de rompimento das células na homogeneização a alta pressão (KLEINIG & MIDDLEBERG, 1998).

As forças inerciais também podem ser um mecanismo importante e previamente não reconhecido no rompimento das células de microrganismos através do processo de alta pressão. É provável que as forças inerciais sejam dominantes sobre as forças de cisalhamento dentro dos fluxos típicos dos homogeneizadores e com isto são uma possível causa do rompimento celular no processo de homogeneização (KLEINIG & MIDDLEBERG, 1998).

WUYTACK et al. (2002) estudou a morte de 11 diferentes espécies de bactérias submetidas ao processo de homogeneização a pressões de 100 a 300 MPa. Todas as bactérias Gram negativas estudadas tiveram sua população significativamente reduzida em pressões acima de 200 MPa. Entre as Gram positivas, algumas apresentaram forte resistência ao tratamento (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Lactobacillus plantarum*). Todas as espécies Gram positivas apresentaram maior resistência ao tratamento do que as Gram negativas.

A Tabela 2 apresenta uma comparação da resistência à pressão de homogeneização de alguns microrganismos de interesse em alimentos:

**Tabela 2 - Comparativo da resistência à pressão de homogeneização entre microrganismos.**

<b>Microrganismo</b>	<b>Pressão (MPa)</b>	<b>n° red. log.*</b>	<b>T (°C)</b>	<b>Substrato</b>	<b>Referência</b>
Escherichia coli	100	2	n.i.	n.i.	Lanciotti et al.,1996
Escherichia coli	150	6	n.i.	n.i.	Lanciotti et al.,1996
Escherichia coli	100	3	n.i.	n.i.	Popper et al.,1990
Streptococcus lactis	100	1	n.i.	n.i.	Popper et al.,1990
Flora natural	200	5	4 °C	suco laranja	Mermelstein, 1999
*no de red. Logarítmicas = - log (população final/ população inicial)					n.i.: não informado

### **Inativação Enzimática**

Há dois grupos de enzimas que podem causar a deterioração da água de coco: a peroxidase e a polifenoloxidase. Estas enzimas causam oxidação de alguns componentes da água de coco, provocando escurecimento do produto. As duas enzimas possuem alta atividade no produto, havendo predominância da atividade da peroxidase.

Definindo uma unidade de atividade enzimática (U), como a quantidade de extrato enzimático capaz de aumentar a absorbância a 425 nm (para a polifenoloxidase) e a 470 nm (para a peroxidase) a taxa de 0,001 unidade por minuto, a polifenoloxidase e a peroxidase apresentam, na água de coco, atividade de 32,1 unidades/mL e 114,3 unidades/mL, respectivamente (CAMPOS, 1996).

O pH ótimo para PFO e para a peroxidase constatado foi de 6,0 e 5,5, respectivamente, sendo que o pH da água de coco (5,0 –5,2) mostrou-se favorável para a ação das duas enzimas. A temperatura ótima para a ação das enzimas foi de 25°C e 35°C, respectivamente (CAMPOS, 1996).

Enzimas relacionadas à qualidade dos alimentos podem ser inativadas por tratamentos a alta pressão. A pressão necessária para a inativação depende da enzima: algumas podem ser inativadas a temperatura ambiente em tratamentos de poucas centenas de MPa enquanto outras podem permanecer ativas após tratamentos acima de 1000 MPa. Em alguns casos, a ativação das enzimas pelo tratamento a alta pressão também foi observada (HENDRICKX et al., 1998). Enzimas como lipase, lipoxigenase, pectinametilesterase, peroxidase e polifenoloxidase podem ser inativadas pela aplicação de

tratamentos a ultra alta pressão (GUERRERO-BELTRAN et al., 2005a). SEYDERHELM et al. (1996) encontrou que o tratamento a alta pressão isostática para inativação ou inibição de atividade enzimática seguia a seguinte ordem (da menos resistente para a mais resistente): lipoxigenase, lactoperoxidase, pectinesterase, lipase, fosfatase, catalase, polifenoloxidase e peroxidase.

A pressão afeta principalmente as estruturas terciárias e quaternárias das proteínas, que são mantidas por interações hidrofóbicas e iônicas e por ligações não covalentes. As pressões muito altas, as estruturas secundárias, mantidas por pontes de hidrogênio, também podem ser afetadas, levando à desnaturação irreversível da proteína. As estruturas primárias das proteínas (ligações covalentes) praticamente não são afetadas pela aplicação de pressão (HENDRICKX et al., 1998).

Com isto, cada enzima responderá diferentemente aos tratamentos a alta pressão, dependendo de sua estrutura e do posicionamento de seu sítio ativo.

Alguns estudos feitos com frutas demonstram a possibilidade de inativar a peroxidase e a polifenoloxidase através do uso de alta pressão, enquanto outros não obtiveram sucesso nesta inativação. GUERRERO-BELTRAN et al. (2005a) sugere que a atividade enzimática residual de produtos de frutas ou vegetais tratados a alta pressão possam ser retardadas através de uma combinação de obstáculos, como refrigeração, diminuição de pH e utilização de agentes anti-escurecimento.

WEEMAES (1998) conseguiu reduzir a atividade da polifenoloxidase em diversas frutas utilizando o processo isostático a temperatura ambiente (25°C). Esta enzima foi inativada em maçã, uva, abacate e pêra através de tratamentos isostáticos a 600, 700, 800 e 900 MPa, respectivamente. O tratamento isostático a temperatura ambiente, utilizando pressões de até 900 MPa não foram eficazes para a inativação da PFO em ameixas. Neste caso, foi necessário utilizar uma combinação de temperatura (50°C) e pressão (900 MPa) para que a PFO tivesse sua atividade reduzida.

ANESE (1995) estudou a ação do tratamento isostático na atividade da peroxidase e da polifenoloxidase obtidas de cenouras e maçãs, respectivamente. Ambas as enzimas apresentaram redução de atividade quando submetidas a tratamentos isostáticos acima de 500 MPa, sendo que a completa inativação destas enzimas ocorreu com tratamentos de 900 MPa. As condições dos tratamentos foram 20°C / 1min. O autor percebeu também um

aumento da atividade das enzimas após tratamento com pressões intermediárias (300 a 500 MPa).

CANO et al. (1997) avaliou a ação do tratamento isostático na peroxidase do morango (0 a 500MPa / 15 minutos). A atividade de peroxidase foi reduzida com o aumento da pressão até 300 MPa, no entanto, foi observada ativação da enzima em pressões acima de 300 MPa.

QUAGLIA (1996) sugere o tratamento em alta pressão isostático como substituto do branqueamento para pêras, obtendo bons resultados na redução de atividade da peroxidase e boa retenção de ácido ascórbico a 900 MPa por 5 minutos (12% de atividade residual de peroxidase e 82% de retenção de ácido ascórbico). O processo foi iniciado a 20°C e as amostras atingiram temperaturas de até 43°C.

LOPEZ-MALO (1998) conseguiu uma inativação apenas parcial das enzimas do purê de abacate, através de tratamentos a pressões isostáticas de 345 a 689 MPa e com o pH variando de 3,9 a 4,3. O tempo de tratamento foi de até 6 minutos, a temperatura de 21°C. O autor sugere o uso de técnicas combinadas para a inativação das peroxidase e da polifenoloxidase e que o uso do tratamento de alta pressão isoladamente é insuficiente.

GUERRERO-BELTRAN et al. (2005b) conseguiu boa estabilidade microbiológica e de cor em um purê de pêsego, por até 30 dias de armazenamento a 3°C. O purê foi tratado a alta pressão (517 MPa / 5 min) e adicionado de agentes anti-escurecimento (ácido ascórbico e cisteína). Neste estudo, foi relatada diminuição da atividade de polifenoloxidase pelo tratamento a alta pressão, que foi potencializada pelo uso dos aditivos.

GUERRERO-BELTRAN et al. (2006) retardou o escurecimento de um purê de manga através da aplicação de pressão (552 MPa / 5 min) aliada à adição de ácido ascórbico. No entanto, o efeito da pressão sobre a atividade de polifenoloxidase neste experimento foi bastante reduzido. A atividade microbiológica foi totalmente eliminada pelo tratamento.

PLAZA et al. (2003) também utilizou a combinação de alta pressão (400 MPa) e aditivos (ácido cítrico e NaCl) para minimizar atividade enzimática e microbiológica em purê de tomate, obtendo um produto com sabor mais próximo ao natural. A inativação da peroxidase chegou a 63% e da polifenoloxidase a 71% da atividade inicial. Na ausência de

NaCl e ácido cítrico, houve ativação das enzimas após o tratamento a alta pressão (50 a 400 MPa).

Não foram encontrados estudos da inativação destas duas enzimas pelo método de homogeneização a ultra alta pressão.

HAYES & KELLY (2003) relataram a inativação de enzimas do leite pelo método de homogeneização a ultra alta pressão (50 MPa a 200 MPa). A atividade de plasmina ocorreu em todas as pressões estudadas, sendo maior na pressão de 200 MPa. No entanto, em teste qualitativo, foi percebida a permanência da atividade da fosfatase alcalina em todos os leites processados. Existe a possibilidade de ter havido redução parcial da atividade desta enzima, mas o estudo não realizou esta verificação.

O processo de homogeneização a alta pressão aumentou consideravelmente a inativação da plasmina presente no leite quando comparado ao processo isostático. Esta diferença está possivelmente ligada a forças físicas induzidas no processo de homogeneização que não estão presentes no processo isostático, como cisalhamento, turbulência e cavitação (HAYES & KELLY, 2003).

### **Manutenção das Características Naturais do Produto**

Após passar pelo processamento, a água de coco, além de ter boa qualidade microbiológica e baixa atividade enzimática, deve apresentar características físico-químicas e sensoriais próximas às do produto natural.

Dentre as características físico-químicas da água de coco, podemos citar: teor de sólidos solúveis (5,0 a 5,5°B) e sólidos totais (5,0 a 7,0%), o teor de açúcares totais (4,0 a 5,5%) e açúcares redutores (4,0 a 5,0%), o teor protéico (18 a 25mg/100mL), o teor de vitaminas e de minerais (0,5 a 0,6%), como sódio (cerca de 50mg/100mL) e potássio (cerca de 300mg/100mL). O pH é de aproximadamente 5,0 a 5,2, enquanto a acidez fica entre 110 e 130 mg de ácido cítrico por 100 mL de água (CAMPOS, 1996).

Quanto às características sensoriais, o produto não deve sofrer alterações perceptíveis, mantendo sua cor, sabor e aroma naturais, pois o tratamento de homogeneização a alta pressão tem ação eficaz na redução de atividade microbiana e enzimática, enquanto mantém compostos menores, responsáveis pelo sabor e pelos valores nutricionais dos alimentos.



## **ESTUDO 1 – Inativação enzimática em água de coco pelo processamento de Homogeneização a Ultra Alta Pressão**

### **1 Introdução**

Tratamentos não-térmicos têm sido estudados objetivando substituir os tradicionais tratamentos térmicos de alguns alimentos e bebidas. O crescente mercado de alimentos minimamente processados tem incentivado ainda mais o desenvolvimento de tratamentos não-térmicos que minimizam as perdas nutricionais e sensoriais nos produtos processados. A água de coco é extraída do endosperma do coco (*Cocos nucifera*), e por ser uma bebida naturalmente isotônica, seu mercado tem apresentado um elevado crescimento nos últimos anos no segmento de repositores de sais e energéticos para esportistas.

Os tratamentos térmicos tradicionais geralmente ocasionam perdas nutricionais e sensoriais nos produtos alimentícios. O tratamento a alta pressão tem sido estudado como uma alternativa para substituir ou complementar os métodos de tratamento térmicos na inativação de enzimas e na destruição de microrganismos.

O processamento da água de coco é feito atualmente através de tratamento térmico (causando alterações sensoriais no produto), por congelamento, ou pela utilização de aditivos químicos. Estes três processos visam eliminar os dois fatores que causam a perda da estabilidade da água de coco: as atividades enzimática e microbiológica.

Dois grupos de enzimas estão presentes na água de coco: peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PFO). Estas enzimas causam oxidação de alguns componentes do produto, levando a alterações de seu sabor e cor. Alguns estudos, realizados em outros produtos, mostraram a possibilidade de inativar estas duas enzimas através de processamento a alta pressão.

WEEMAES (1998) conseguiu reduzir a atividade da polifenoloxidase em diversas frutas utilizando o processo de alta pressão a temperatura ambiente (25°C). Esta enzima foi inativada em maçã, uva, abacate e pêra através de tratamentos isostáticos a 600, 700, 800 e 900 MPa, respectivamente. O tratamento isostático a temperatura ambiente, utilizando pressões de até 900 MPa não foi eficaz para a inativação da PFO em ameixas. Neste caso,

foi necessário utilizar uma combinação de temperatura (50°C) e pressão (900 MPa) para que a PFO tivesse sua atividade reduzida.

ANESE (1995) estudou a ação do tratamento isostático na atividade da peroxidase e da polifenoloxidase obtidas de cenouras e maçãs, respectivamente. Ambas as enzimas apresentaram redução de atividade quando submetidas a tratamentos isostáticos acima de 500 MPa, sendo que a completa inativação destas enzimas ocorreu com tratamentos de 900 MPa. O tempo utilizado nos tratamentos foi de um minuto e a temperatura de 20°C. O autor percebeu também um aumento da atividade das enzimas após tratamento com pressões intermediárias (300 a 500 MPa).

QUAGLIA (1996) sugere o tratamento a alta pressão como substituto do branqueamento para pêras, obtendo bons resultados na redução de atividade da peroxidase e boa retenção de ácido ascórbico através de um tratamento isostático a 900 MPa por 5 minutos (12% de atividade residual de peroxidase e 82% de retenção de ácido ascórbico). O processo foi iniciado a 20°C e as amostras chegaram a temperaturas de até 43°C.

LOPEZ-MALO (1998) conseguiu uma inativação apenas parcial das enzimas do purê de abacate, através de tratamentos a pressões isostáticas de 345 a 689 MPa com o pH do produto variando de 3,9 a 4,3. O tempo de tratamento foi de até 6 minutos, a temperatura de 21°C. O autor sugere o uso de técnicas combinadas para a inativação das peroxidase e da polifenoloxidase, sugerindo que o uso do tratamento a alta pressão isostático isoladamente é insuficiente.

Este trabalho estuda os efeitos dos níveis de pressão utilizados (de 0 a 300 MPa), do pH do produto, e de tratamentos consecutivos (simples, duplos ou triplos) do processo de homogeneização a alta pressão nas atividades da POD e da PFO.

## **2 Objetivos**

Este trabalho visa estudar o efeito do tratamento de homogeneização a alta pressão nas atividades das enzimas presentes na água de coco – a peroxidase (POD) e a polifenoloxidase (PFO).

O efeito da pressão de processo na atividade das duas enzimas é estudado inicialmente. Em seguida, avaliou-se a influência de tratamentos consecutivos (ou múltiplos) na atividade das enzimas.

Por último, a influência do pH do produto e da pressão de processo na atividade das enzimas são estudadas conjuntamente, através de um planejamento experimental.

### **3 Material e Métodos**

#### **3.1 Equipamento**

O processamento HUAP foi realizado no equipamento nG7400H:320, fabricado pela Stansted Fluid Power (Stansted, Inglaterra), que atinge pressões de até 320 MPa. O equipamento possui um sistema de dois pistões, que trabalham sincronizados e alternadamente, de forma a manter a pressão de processo estável e contínua durante o processamento.

Um sistema de alimentação composto de duas válvulas foi acoplado antes da entrada do produto no equipamento, permitindo alternar a entrada do produto de dois diferentes recipientes. Um dos recipientes continha água destilada, e o outro água de coco, de forma a permitir o trabalho alternado entre os dois produtos sem a necessidade de pausar o processamento.

Na saída do equipamento, havia um pequeno trocador de calor tubular que trabalha com água corrente como meio de resfriamento, permitindo a redução da temperatura do produto até cerca de 30°C. Na saída deste trocador, foi acoplada uma serpentina de inox, que foi imersa em banho de gelo, para permitir o resfriamento do produto até cerca de 5°C.

Após a saída da serpentina, um sistema de enchimento composto por duas saídas (uma para enchimento e uma para descarte) e uma válvula de três vias foi montado dentro de uma cabine de fluxo laminar (esterilizada com o uso de uma lâmpada Ultravioleta) para permitir o envase asséptico do produto.

#### **3.2 Água de Coco**

Os cocos verdes utilizados (*Cocos nucifera*) foram obtidos junto ao CEASA/Campinas nas datas dos ensaios. O estágio de maturação dos frutos não foi controlado.

Os frutos foram lavados em água corrente em um tanque de aço e posteriormente sanitizados em água clorada (5ppm de cloro). Antes da extração da água foram refrigerados (2°C) e então perfurados um a um, utilizando um perfurador manual (Figura 1.1). Após a

extração, a água foi filtrada em filtro de café (Melitta 103) para eliminação de partículas maiores (principalmente restos de fibras da casca). O pH foi ajustado para 5,3 com solução de ácido cítrico 0,1M ou hidróxido de sódio 0,1N. A temperatura de entrada do produto no equipamento foi ajustada para 10°C, e a porcentagem de sólidos solúveis mantida em 5,0°B. Como todas as extrações apresentaram percentual de sólidos solúveis de 5,0°B, não foram necessários ajustes.

O fato de todas as mesclas de águas de coco terem apresentado o mesmo teor de sólidos solúveis indica que os cocos utilizados estavam em estágios de maturação semelhantes, já que esta o teor de sólidos solúveis da água de coco se altera durante a maturação do fruto.



**Figura 1.1 – Perfurador de cocos**

Para o planejamento experimental, a água de coco, depois de filtrada e padronizada, foi acondicionada em garrafas de PET (polietileno tereftalado) de um litro e congelada em câmara fria (-20°C). Conforme a necessidade de uso, a água de coco era descongelada a temperatura ambiente.

### **3.3 Processamento**

Iniciou-se o processo utilizando água destilada para eliminar o ar do sistema e estabilizar a pressão. Alcançado o regime, o equipamento passava a ser alimentado com água de coco previamente filtrada e padronizada conforme descrito anteriormente. Utilizando-se o sistema de válvulas instalado na entrada do equipamento, pode-se alternar a alimentação entre água destilada e água de coco sem necessidade de pausar o processamento.

A água de coco foi bombeada através da válvula de homogeneização, ajustando as pressões para 0, 50, 100, 150, 200, 250 e 300 MPa. O equipamento permite uma vazão de cerca de 270mL por minuto para o produto.

Após o processamento, o produto foi rapidamente refrigerado até 5°C, utilizando-se um trocador de calor e uma serpentina imersa em banho de gelo. Duas amostras foram coletadas para cada pressão, além de duas amostras de produto não processado. As atividades enzimáticas foram medidas logo após o término do processamento.

No estudo dos tratamentos múltiplos, o produto foi bombeado utilizando-se pressões de 100, 200 e 300 MPa e coletado em béqueres para reprocessamento. O produto foi processado três vezes para cada pressão, e amostras foram coletadas em cada estágio de processamento para avaliação da atividade enzimática.

Os dois estudos foram realizados em duplicata.

No planejamento experimental, a água de coco, depois de descongelada, teve seu pH ajustado para o pH de estudo (dependente de cada processamento) utilizando-se solução de ácido cítrico ou hidróxido de sódio. O restante do procedimento foi idêntico ao realizado para o primeiro estudo.

Após cada processamento, o sistema foi enxaguado com água destilada por cerca de 10 minutos e em seguida preenchido com etanol a 70% (v/v), permanecendo inundado pelo álcool por um período de pelo menos 24h.

As temperaturas do produto foram medidas na entrada (termômetro de mercúrio) e após a válvula de homogeneização, na entrada e na saída do trocador de calor com

termopares tipo T acoplados a um aquisitor de dados (Barnat Company – 12 Channel Scanning Thermocouple Thermometer).

### **3.4 Avaliação das Atividades Enzimáticas**

As atividades de PFO e POD foram determinadas pelos métodos descritos por PONTING & JOSLYN (1948) e por FEHRMANN & DIAMOND (1967), respectivamente.

Para a PFO, foram misturados em um tubo de ensaio 4,5mL de tampão fosfato pH 6,0 e 1,5mL de catecol, deixando em banho a 25°C até estabilizar a temperatura (aprox. 20 min). Adicionou-se então 2mL de água de coco e foram medidas as mudanças na absorbância a 425nm em intervalos de 1 minuto durante 8 minutos.

Para a POD, foram misturados em um tubo de ensaio 6,0mL de tampão fosfato pH 5,5 e 2,0mL de água de coco, deixando em banho a 35°C até estabilizar a temperatura (aprox. 20 min). Adicionou-se então 1,5mL de guaiacol e 0,5mL de peróxido de hidrogênio e foram medidas as mudanças na absorbância a 470nm em intervalos de 1 minuto durante 8 minutos.

Os valores de pH e temperatura utilizados foram determinados como ótimos para a atividade das duas enzimas presentes na água de coco por CAMPOS (1996).

Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de água de coco capaz de aumentar a absorbância a taxa de 0,001 unidade por minuto. A atividade relativa foi definida como a atividade enzimática do produto processado, dividida pela atividade do mesmo produto não processado.

### **3.5 Análises Físico-Químicas**

- pH (A.O.A.C. n° 42.1.04 Official Method n° 981.12 (1997));
- Sólidos Solúveis (A.O.A.C. n° 37.1.15 Official Method n° 932.12 (1997));

## **4 Resultados e Discussões**

### **Curvas de Inativação das Enzimas**

Na primeira etapa do estudo foram obtidas as curvas de atividade relativa das duas enzimas de acordo com a pressão de processo utilizada. As Tabelas 1.1 e 1.2 apresentam os resultados obtidos nesta etapa do estudo. A Figura 1.1 mostra a média das duas das curvas obtidas nos ensaios realizados (uma para PFO e uma para POD), ilustrando a tendência de aumento da atividade das duas enzimas causada pelo processo HUAP, principalmente nas pressões intermediárias (50 a 150 MPa)

**Tabela 1.1 – Atividade relativa da polifenoloxidase em função da pressão de processo – média (M), desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) – expressos em %.**

<b>Pressão</b>	<b>Atividade Relativa – PFO</b>		
<b>(MPa)</b>	<b>M</b>	<b>P</b>	<b>CV</b>
<b>0</b>	117,5	13,8	11,7
<b>50</b>	123,3	11,1	9,0
<b>100</b>	129,4	11,4	8,8
<b>150</b>	115,2	22,9	19,9
<b>200</b>	115,8	13,7	11,9
<b>250</b>	111,8	13,2	11,8
<b>300</b>	90,7	16,4	18,1

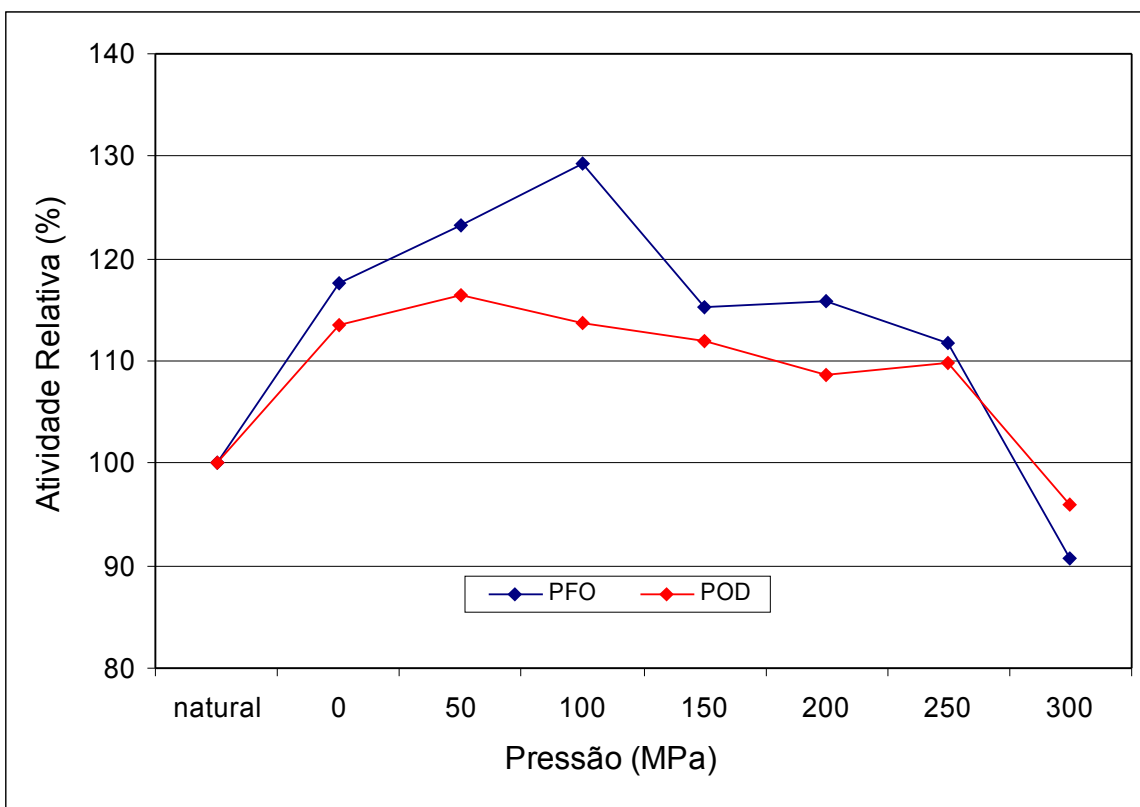


**Tabela 1.2 – Atividade relativa da peroxidase em função da pressão de processo – média (M), desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) – expressos em %.**

<b>Pressão (MPa)</b>	<b>Atividade Relativa – POD</b>		
	<b>M</b>	<b>DP</b>	<b>CV</b>
<b>0</b>	113,4	5,5	4,8
<b>50</b>	116,3	7,8	6,7
<b>100</b>	113,7	3,9	3,4
<b>150</b>	112,0	8,9	7,9
<b>200</b>	108,6	7,2	6,6
<b>250</b>	109,9	8,1	7,4
<b>300</b>	96,0	10,5	11,0

Observa-se que os produtos que passaram pelo processo HUAP em pressões de até 250MPa apresentaram aumento na atividade enzimática (atividade relativa maior do que 100%). Todos os produtos apresentaram atividade relativa maior do que 100% para as duas enzimas, exceto o produto tratado a 300 MPa. A atividade enzimática máxima da PFO foi observada no produto tratado a 100 MPa, enquanto para a POD, o valor máximo foi atingido no produto processado a 50 MPa. Em pressões maiores do que 150 MPa, observa-se uma relação de efeito negativo na atividade com o aumento da pressão de processo.

As menores atividades enzimáticas de produtos processados foram observadas naqueles que receberam tratamento mais severo (300 MPa), onde houve uma ligeira inativação da PFO (9,3%) e da POD (4,0%). No entanto, os valores obtidos para as atividades de ambas as enzimas são muito elevados para estabilização do produto.



**Figura 1.2 – Curvas de atividade relativas da POD e PFO em função da pressão de processo**

Estudo similar realizado por ANESE (1995) utilizando tratamento isostático em cenoura (POD) e maçãs (PFO) apresentou resultados semelhantes. Tratamentos utilizando pressões de até 500 MPa causaram aumento na atividade das enzimas. A inativação parcial foi obtida com tratamentos de 500 MPa ou maiores, sendo que a inativação total das enzimas só foi possível com a utilização de 900 MPa.

ASAKA & HAYASHI (1991) estudaram o efeito do tratamento a alta pressão isostático na atividade da polifenoloxidase de pêras. Os resultados seguiram a mesma tendência, sendo que a ativação máxima se deu com tratamentos a pressões entre 400 e 500 MPa.

Baseados em outros trabalhos que estudam a ativação da PFO por dodecil sulfato de sódio (KENTEN, 1958; ANGLETON & FLURKEY, 1984), ASAKA sugere que o fenômeno de ativação da enzima acontece devido à presença no produto de enzimas na forma latente,

que são ativadas pelo tratamento por alta pressão, de maneira similar à ativação ocasionada pelo tratamento com dodecil sulfato de sódio.

Os tratamentos nas pressões mais elevadas (Tabelas 1.1 e 1.2) apresentaram os menores valores para as atividades relativas. Provavelmente as enzimas sofrem algum outro tipo de alteração estrutural quando submetidas a pressões mais elevadas, o que causa uma inativação parcial de sua atividade.

Esta posterior alteração na estrutura protéica pode estar relacionada ao tratamento mais rigoroso (submissão a pressões mais elevadas), ou a uma inativação térmica parcial das enzimas devido ao aumento de temperatura na despressurização, embora as temperaturas não tenham atingido valores maiores do que 80°C em nenhum dos processamentos e o tempo de exposição do produto a estas temperaturas ter sido mínimo (cerca de 7 décimos de segundo até a entrada do trocador de calor).

A PFO pareceu ser mais susceptível à alteração estrutural devido a aplicação da pressão, uma vez que apresentou maiores variações nos valores de atividade enzimática, seja na ativação como na inativação.

Os números indicam que tratamentos com pressões superiores a 300 MPa tenderiam a causar uma maior inativação das enzimas. Os resultados sugerem ainda que pressões muito elevadas teriam que ser utilizadas para se obter uma inativação satisfatória para um processamento comercial de forma a manter a estabilidade do produto por um período prolongado utilizando-se apenas o tratamento de alta pressão.

GUERRERO-BELTRAN et al. (2005a) sugere que a atividade enzimática residual de produtos de frutas ou vegetais tratados a alta pressão possam ser retardadas através de uma combinação de obstáculos, como refrigeração, diminuição de pH e utilização de agentes anti-escurecimento.

Dois trabalhos relatam bons resultados na utilização da combinação de alta pressão isostática a aditivos químicos para inativação da polifenoloxidase em purê de pêssego (GUERRERO-BELTRAN et al., 2005b) e em purê de manga (GUERRERO-BELTRAN et al., 2006).

Não é possível prever o comportamento da água de coco se esta fosse tratada pelo método HUAP combinado ao uso de agentes anti-escurecimento, já que há evidências de

diferenças significativas entre os métodos de alta pressão isostática e o método de homogeneização. No entanto, seria interessante avaliar a possibilidade de obtenção de melhores resultados na inativação das enzimas através do uso destes aditivos.

### **Estudo do Efeito de Tratamentos Consecutivos na Atividade Enzimática**

Na segunda etapa do projeto, os processamentos múltiplos a 300 MPa apresentaram resultados mais satisfatórios na inativação de ambas as enzimas presentes na água de coco. Como mostrado nas Tabelas 1.3 e 1.4, as atividades enzimáticas das duas enzimas foram reduzidas em mais de 35% com o processamento triplo a 300 MPa. Pressões de 100 e 200 MPa foram insuficientes para causar inativação das enzimas, mesmo quando utilizadas nos tratamentos múltiplos.

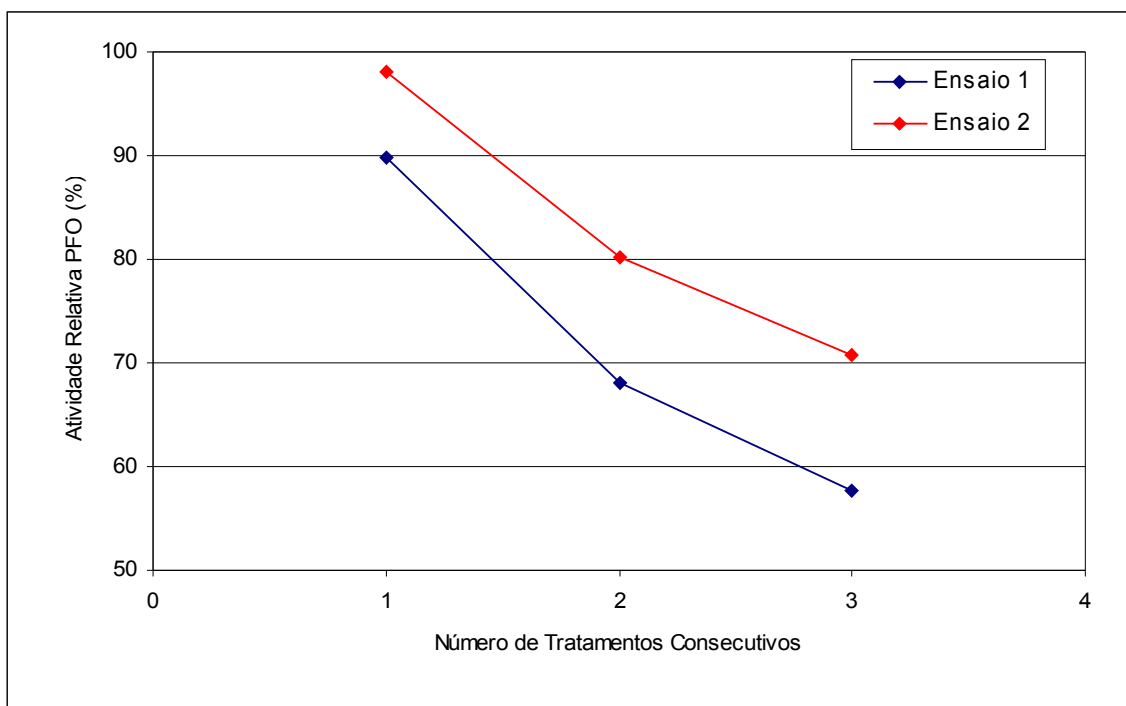
**Tabela 1.3 – Atividade relativa da PFO após 1, 2 ou 3 processamentos consecutivos utilizando diferentes pressões de processo**

<b>Pressão (MPa)</b>	<b>1x</b>	<b>2x</b>	<b>3x</b>
<b>100</b>	133,3±19,8	132,1±11,8	125,9±17,8
<b>200</b>	123,5±15,1	116,2±19,4	107,0±13,5
<b>300</b>	94,0±5,9	74,1±8,6	64,2±9,3

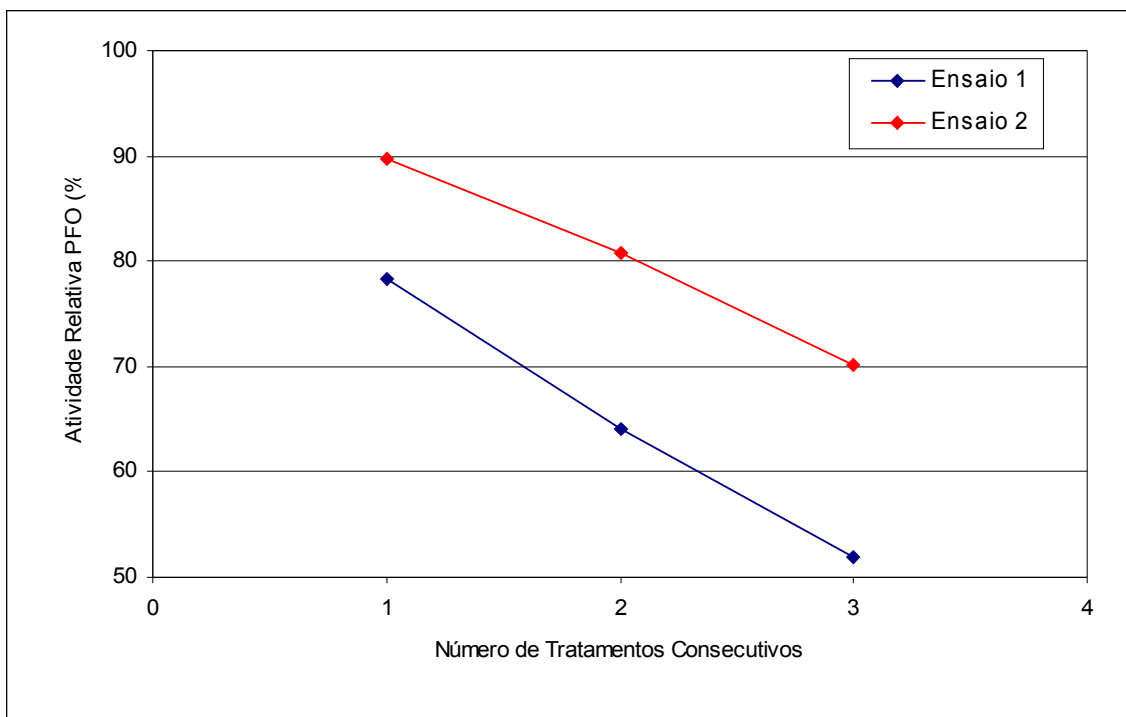
**Tabela 1.4 – Atividade relativa da POD após 1, 2 ou 3 processamentos consecutivos utilizando diferentes pressões de processo**

<b>Pressão (MPa)</b>	<b>1x</b>	<b>2x</b>	<b>3x</b>
<b>100</b>	111,4±1,7	113,1±5,1	103,5±7,6
<b>200</b>	107,6±5,8	101,8±7,5	93,7±5,7
<b>300</b>	84,0±8,2	72,4±11,9	61,0±12,9

Observa-se que não há uma potencialização do efeito de inativação do segundo para o terceiro tratamento, já que a inativação causada pelo segundo tratamento isoladamente é maior (para a PFO) ou igual (para a POD) do que a causada pelo terceiro tratamento. Isto é visualizado com maior clareza através das Figuras 1.2 e 1.3, pela diferença de inclinação entre o primeiro e o segundo trecho das curvas obtidas.



**Figura 1.3 – Atividade relativa de PFO após 1, 2 ou 3 tratamentos consecutivos a 300 Mpa**



**Figura 1.4 – Atividade relativa de POD após 1, 2 ou 3 tratamentos consecutivos a 300 Mpa**

Analisando estes resultados, pode-se concluir que a obtenção de uma redução mais significativa na atividade enzimática se deve principalmente à soma dos efeitos causados por cada um dos processamentos isoladamente, e não devido a uma potencialização dos efeitos causada pelos tratamentos consecutivos.

WUYTACK et al. (2002) também observou apenas um efeito aditivo ao realizar tratamentos HUAP consecutivos para eliminação de microrganismos. Assim como neste trabalho, os pesquisadores não observaram potencialização do efeito do tratamento após passagens consecutivas pelo homogeneizador.

Os valores encontrados para as atividades relativas no primeiro processamento nas diferentes pressões foram um pouco diferentes dos valores encontrados na primeira etapa do processo. Isto provavelmente está relacionado a diferenças nas matérias-primas utilizadas. Alteração do grau de maturação ou das condições de cultivo podem ocasionar diferenças no fruto e alterações nas propriedades das enzimas.

### **Planejamento Experimental**

No planejamento experimental, foram estudadas pressões de 0 a 300 MPa e pH de 4,5 a 6,0. Os valores das variáveis utilizados são apresentados na Tabela 1.5.

**Tabela 1.5 – Valores das variáveis independentes utilizadas no planejamento experimental.**

<b>Variável</b>	<b>-√2</b>	<b>-1</b>	<b>0</b>	<b>+1</b>	<b>+√2</b>
<b>Pressão (MPa)</b>	0	44	150	256	300
<b>PH</b>	4,50	4,72	5,25	5,78	6,00

Utilizando estas variáveis, foram realizados 11 ensaios, obtendo-se os resultados apresentados na Tabela 1.6.

**Tabela 1.6 – Resultados dos ensaios realizados na etapa de planejamento experimental**

<b>Ensaio</b>	<b>Pressão (MPa)</b>	<b>pH</b>	<b>Atividade Relativa PFO</b>	<b>Atividade Relativa POD</b>
1	44	4,72	152,82	109,20
2	44	5,78	102,84	111,45
3	256	4,72	115,86	91,77
4	256	5,78	99,36	97,53
5	150	5,25	105,65	102,69
6	150	5,25	89,34	107,98
7	150	5,25	88,14	106,74
8	150	4,50	108,31	83,39
9	150	6,00	85,77	105,48
10	0	5,25	108,55	107,56
11	300	5,25	65,38	81,19

Para análise dos resultados do planejamento experimental, a atividade relativa de cada uma das enzimas será tratada como uma variável dependente, separadamente.

### *Polifenoloxidase*

Ao analisar os efeitos da pressão e pH na atividade relativa da polifenoloxidase (Tabela 1.7), notou-se que tanto a pressão quanto o pH apresentaram efeito negativo no valor da atividade de polifenoloxidase. As interações entre P e pH e as interações quadráticas não apresentaram efeito significativo ( $p < 0,10$ ). Isto indica que, dentro da faixa de estudo, quanto maior o valor do pH do produto e da pressão de processo, menor será a atividade relativa da enzima no produto processado, ou seja, o processamento causará maior inativação na enzima.

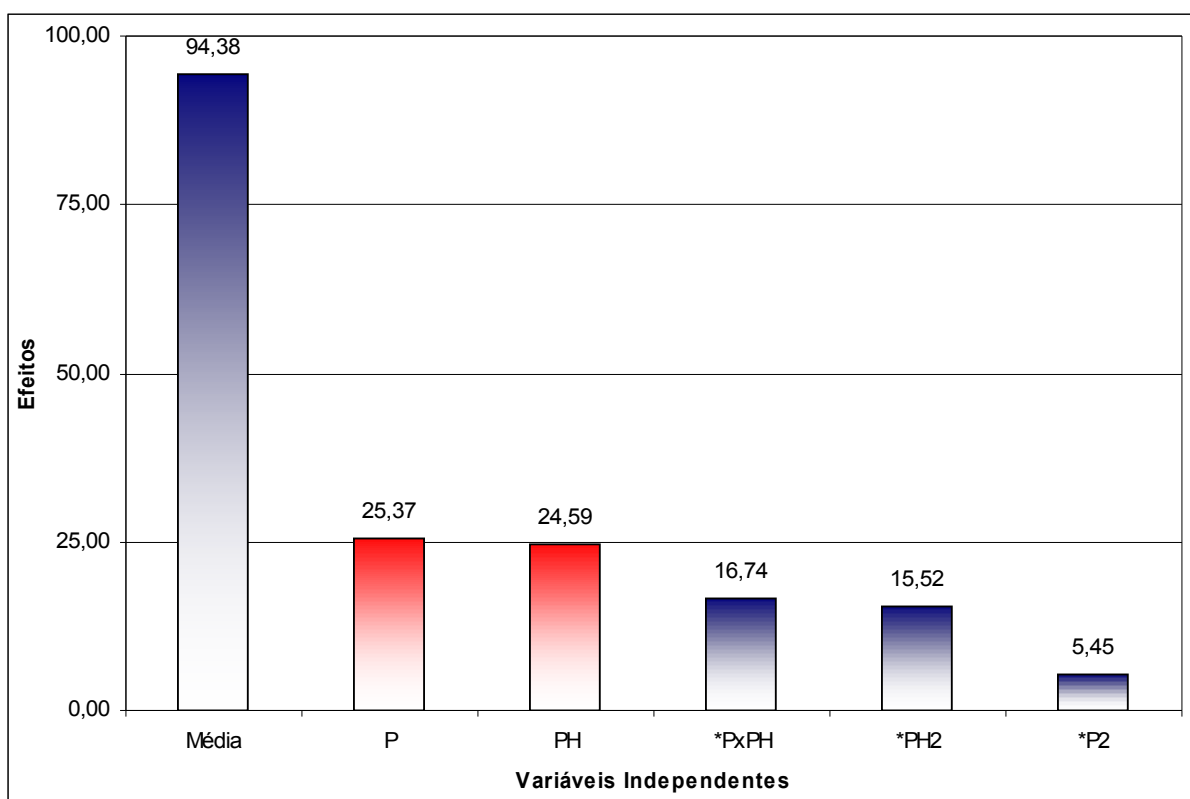
**Tabela 1.7 – Análise dos efeitos da pressão de processo e do pH na atividade relativa da PFO**

MS Erro Puro=95,65897; $R^2=0,64495$				
	Efeito	DP (Erro Puro)	t(2)	P
Média	94,38019	5,646798	16,71393	0,003561
P	-25,3718	6,91592	-3,66861	0,066928
<b>*P<sup>2</sup></b>	<b>5,445461</b>	<b>8,231658</b>	<b>0,661527</b>	<b>0,576294</b>
pH	-24,5897	6,91592	-3,55552	0,070804
<b>*pH<sup>2</sup></b>	<b>15,51673</b>	<b>8,231658</b>	<b>1,885007</b>	<b>0,200093</b>
<b>*PxpH</b>	<b>16,73827</b>	<b>9,78054</b>	<b>1,711385</b>	<b>0,22914</b>

\*valores em negrito indicam efeito não significativo ( $p < 0,10$ )

Através da Figura 1.4 pode-se visualizar a significância dos efeitos da pressão, pH, e de suas interações.





**Figura 1.5 – Histograma dos efeitos da pressão de processo e pH na atividade relativa da PFO – barras em vermelho indicam efeitos negativos**

Desconsiderando os efeitos não significativos, pode-se obter coeficientes para um modelo que descreva o comportamento da atividade relativa da enzima em função das variáveis independentes, na região estudada.

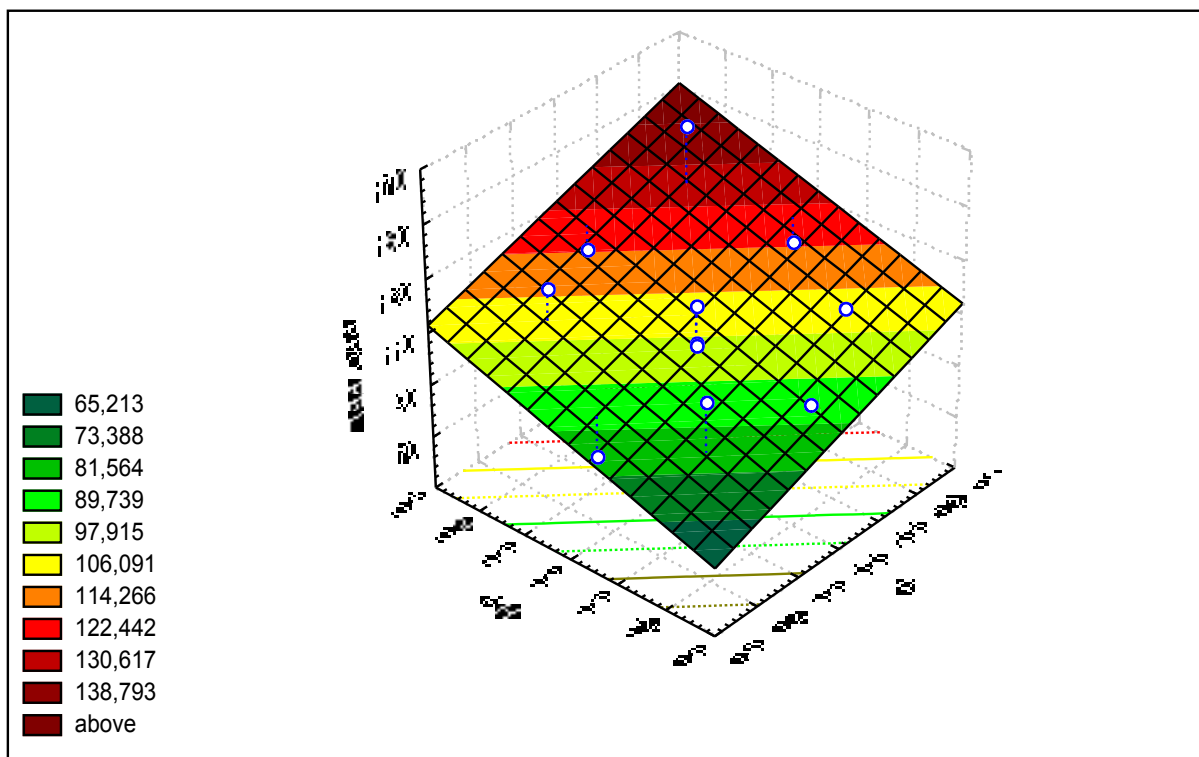
**Tabela 1.8 – Coeficientes do modelo: atividade relativa da PFO em função da pressão e pH**

MS Erro Puro=95,65897 ; $R^2=0,51644$				
	Coef. Regr.	DP (Erro Puro)	t(2)	P
<b>Média</b>	102,0027	2,948944	34,58958	0,000835
<b>P</b>	-12,6859	3,45796	-3,66861	0,066928
<b>PH</b>	-12,2949	3,45796	-3,55552	0,070804

Desta forma, obtemos o seguinte modelo para atividade relativa de PFO:

$$\text{Log } (A/A_0) = 102,0 - 12,7P - 12,3\text{pH}$$

Este modelo é representado graficamente pela superfície de resposta apresentada na Figura 1.5. As variáveis devem ser substituídas na fórmula de acordo com a codificação apresentada na Tabela 1.5.



**Figura 1.6 – Superfície de Resposta: atividade relativa da PFO em função da pressão e pH**

Os resultados obtidos indicam que uma redução significativa da atividade desta enzima pode ser obtida através de um tratamento a 300 MPa em pH 6,0, embora não se tenha realizado um ensaio com estes parâmetros.

A Tabela 1.9 mostra os resultados da análise de variância do modelo e do teste F. O valor de F calculado é ligeiramente maior do que o valor de F tabelado. Isto significa que o modelo é estatisticamente válido. Porém, o modelo se aplica a uma pequena faixa de variação dos valores estudados e com isto não pode ser considerado um modelo preditivo. Para o modelo ser considerado preditivo o valor de F calculado deve ser de 4 a 5 vezes maior do que o valor de F tabelado.

**Tabela 1.9 – Análise de Variância do modelo: atividade relativa da PFO em função da pressão e pH**

	SQ	GL	MQ	Fcalc	Ftab	Fc/Ft
Regressão	2496,74	2	1248,37	4,27	3,11	1,37
Resíduos	2337,79	8	292,22			
Falta de Ajuste	2146,47	6	357,74	3,74		
Erro Puro	191,318	2	95,66			
Total	4834,53	10				

### *Peroxidase*

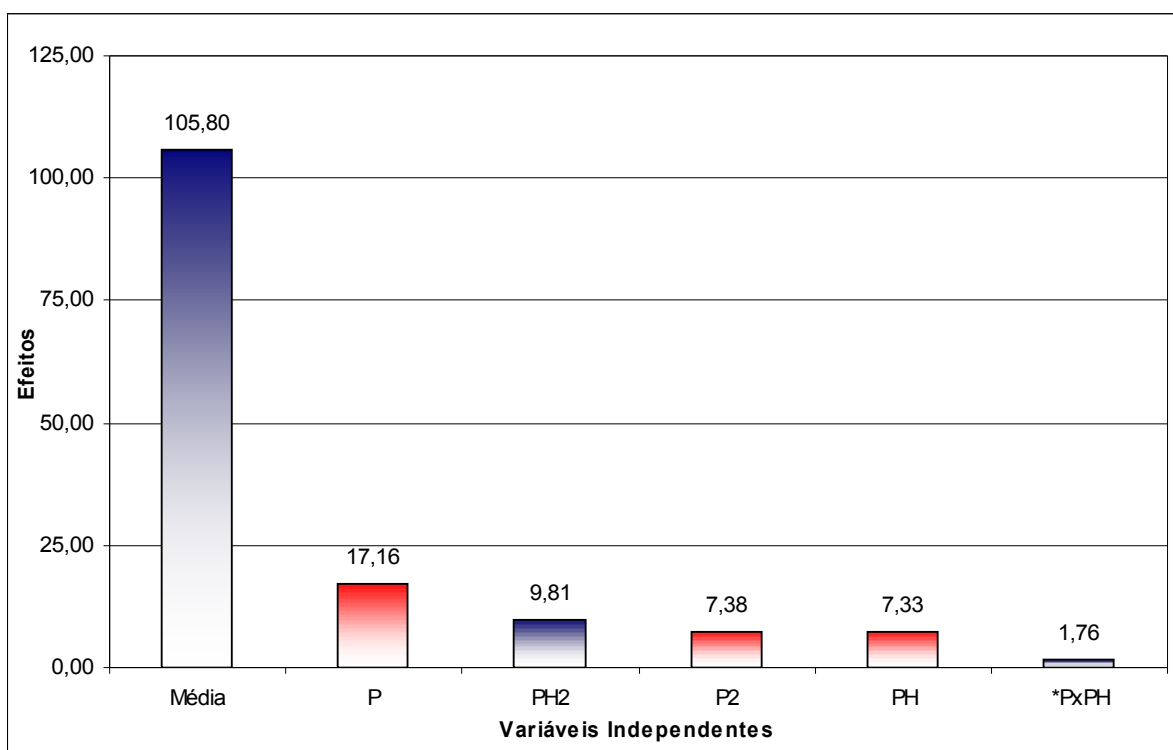
Na atividade relativa da peroxidase, todas as variáveis apresentaram efeito significativo, exceto a interação entre pressão e pH (Tabela 1.10). A pressão (linear e quadrática) e o pH (quadrático) apresentaram efeito negativo, enquanto o pH (linear) apresentou efeito positivo no valor da atividade relativa da peroxidase.

Através da Figura 1.6 pode-se visualizar a significância dos efeitos da pressão, pH, e de suas interações.

**Tabela 1.10 – Análise dos efeitos da pressão de processo e do pH na atividade relativa da POD**

MS Erro Puro=7,651956 ; $R^2=0,80551$				
	Efeito	DP (Erro Puro)	t(2)	P
Média	105,8016	1,597076	66,24705	0,000228
P	-17,1579	1,95602	-8,77185	0,012748
P <sup>2</sup>	-7,38217	2,328149	-3,17083	0,086719
PH <sup>2</sup>	9,810832	1,95602	5,015711	0,037527
PH	-7,32708	2,328149	-3,14717	0,08786
<b>*PxPH</b>	<b>1,756521</b>	<b>2,766217</b>	<b>0,63499</b>	<b>0,59039</b>

\*valores em negrito - efeito não significativo ( $p < 0,10$ )



**Figura 1.7 – Histograma dos efeitos da pressão de processo e pH na atividade relativa da POD – barras em vermelho indicam efeitos negativos**

Desconsiderando o efeito da interação entre pressão e pH, pode-se obter coeficientes para um modelo que descreva o comportamento da atividade relativa da enzima em função das variáveis independentes, na região estudada.

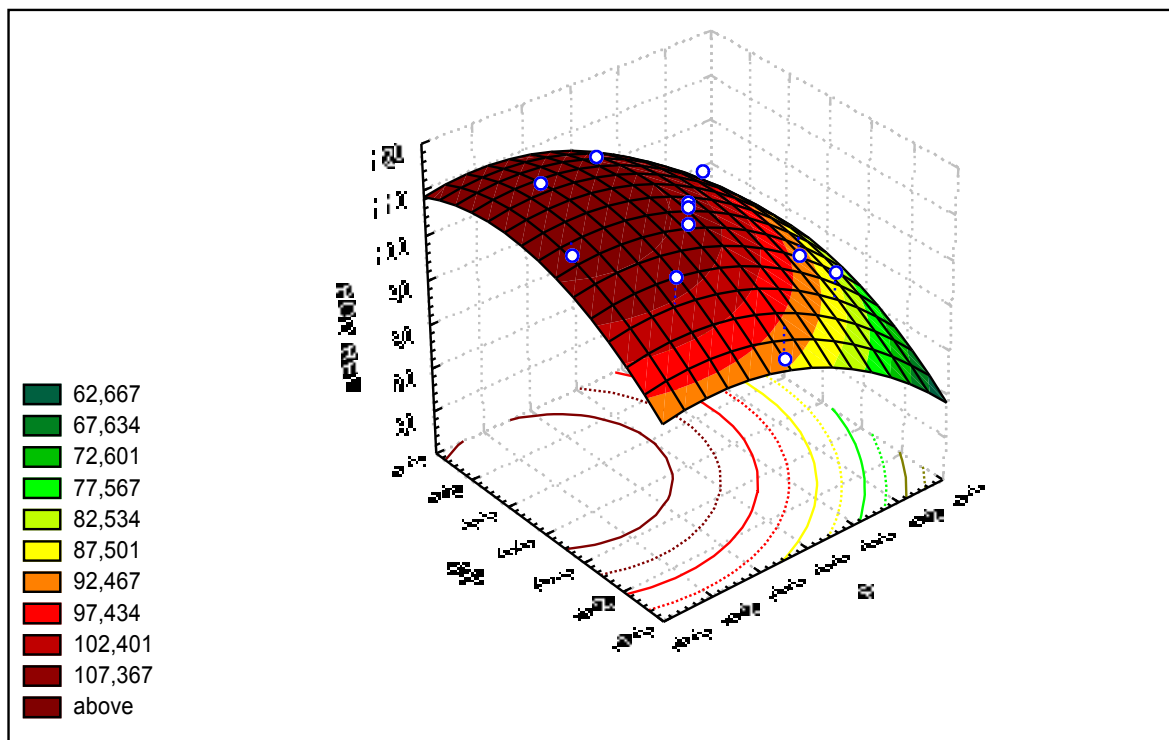
**Tabela 1.11 – Coeficientes do modelo: atividade relativa da POD em função da pressão e pH**

MS Erro Puro=7,651956 ; R <sup>2</sup> =,80276				
	<b>Coef. Regr.</b>	<b>DP (Erro Puro)</b>	<b>t(2)</b>	<b>p</b>
<b>Média</b>	105,8016	1,597076	66,24705	0,000228
<b>P</b>	-8,57896	0,97801	-8,77185	0,012748
<b>P<sup>2</sup></b>	-3,69108	1,164074	-3,17083	0,086719
<b>PH</b>	4,905416	0,97801	5,015711	0,037527
<b>PH<sup>2</sup></b>	-3,66354	1,164074	-3,14717	0,08786

Desta forma, obtemos o seguinte modelo para atividade relativa de POD :

$$\text{Log (A/A}_0\text{)} = 105,8 - 8,6P - 3,7P^2 + 4,9\text{pH} - 3,7\text{pH}^2$$

Este modelo é representado graficamente pela superfície de resposta apresentada na Figura 1.7. As variáveis devem ser substituídas na fórmula de acordo com a codificação apresentada na Tabela 1.5.



**Figura 1.8 – Superfície de Resposta: atividade relativa da POD em função da pressão e pH**

Observando a superfície de resposta, notamos que nos pHs acima do ponto central estudado (5,25) são pouco adequados para inativação da POD. Pode-se obter reduções mais significativas na atividade da peroxidase em valores de pH reduzidos (mais ácidos). Estes valores de pH são os mais indicados para um processamento HUAP que tenha como objetivo a inativação desta enzima.

Estes resultados são incompatíveis com os apresentados para a PFO, onde pHs mais elevados apresentaram as maiores inativações da enzima.

A Tabela 1.12 mostra os resultados da análise de variância do modelo e do teste F. O valor de F calculado é ligeiramente maior do que o valor de F tabelado. Isto significa que o modelo é estatisticamente válido. Porém, o modelo se aplica a uma pequena faixa de variação dos valores estudados e com isto não pode ser considerado um modelo preditivo. Para o modelo ser considerado preditivo o valor de F calculado deve ser de 4 a 5 vezes maior do que o valor de F tabelado.

**Tabela 1.12 – Análise de Variância do modelo: atividade relativa da POD em função da pressão e pH**

	SQ	GL	MQ	Fcalc	Ftab	Fc/Ft
Regressão	934,01	4	233,50	6,34	3,18	1,99
Resíduos	220,96	6	36,82			
Falta de Ajuste	205,66	4	51,41	6,72		
Erro Puro	15,30	2	7,65			
Total	1120,27	10				

## **5 Conclusões**

Tratamentos de homogeneização a pressão de até 300 MPa não foram suficientes para causar inativação satisfatória das enzimas presentes na água de coco. Existem evidências de que o tratamento pode ser eficaz se for efetuado em pressões mais elevadas, por exemplo, de 500 MPa.

De modo geral, a POD apresentou maior resistência ao tratamento HUAP do que a PFO.

O estudo da influência do pH do produto na inativação das enzimas durante o tratamento HUAP mostrou resultados diferenciados para as duas enzimas. Para a PFO, inativações mais satisfatórias devem ser obtidas através de tratamentos com aplicação de altas pressões em produtos com pH elevado. Já para a POD, resultados mais significativos podem ser alcançados ao submeter produtos de pH ácido a pressões elevadas. Para a água de coco as duas enzimas devem ser inativadas e a utilização de pHs mais ácidos deve ser mais adequada de forma a facilitar a inativação da POD, que apresentou maior resistência ao tratamento, de uma maneira geral.

Os tratamentos múltiplos a 300 MPa apresentaram uma boa redução na atividade das enzimas, principalmente no caso da PFO. A inativação da PFO em tratamento triplo a 300 MPa foi a mais significativa dentre todos os processos testados. Esta inativação é ocasionada pela soma dos efeitos de cada processamento, já que não foi verificada uma potencialização do efeito dos tratamentos HUAP quando realizados seqüencialmente.

Embora o tratamento HUAP não tenha mostrado grande eficiência na inativação das enzimas presentes na água de coco nos estudos realizados, há indícios de que sua eficiência pode ser melhorada através do ajuste do pH do produto, uso de tratamentos múltiplos e, principalmente, pelo uso de pressões maiores do que as alcançadas pelo equipamento em estudo, além de haver a possibilidade de inibição da atividade enzimática pela diminuição da temperatura de armazenamento ou uso de aditivos químicos.



## 6 Bibliografia

ANESE; M.; NICOLI, M.C.; DALL'AGLIO, G.; LERICI, C.R. Effect of high pressure treatments on peroxidase and polyphenoloxidase activities **Journal of Food Biochemistry**; v. 18, n. 4, p. 285-293, 1995.

ASAKA, M.; HAYASHI, R. Activation of Polyphenoloxidase in Pear Fruits by High Pressure Treatment **Agriculture Biology Chemistry**, v. 55, n. 9, p. 2439-2440, 1991.

BARBOSA-CÁNOVAS, G.V.; POTHAKAMURY, U.R.; PALOU, E.; SWANSON, B.G. Nonthermal Preservation of Foods, 276p., Marcel Dekker Inc., New York, 1998.

BRUNS, R.E.; BARROS NETO, B.; SCARMINIO, J.S. **Planejamento e Otimização de Experimentos**. 2.ed. Campinas: Editora da Unicamp, 1995. 299 p.

CAMPOS, C.F.; SOUZA, P.E.A., COELHO, J.V.; GLORIA, M.B.A. Chemical Composition, Enzyme Activity and Effect of Enzyme Inactivation on Flavor Quality of Green Coconut Water **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 20, n 26, p. 487-500, 1996.

FERHRMANN, W.L.; DIAMOND, A.E. Peroxidase activity and phytopora resistance in different organs of potato plant. **Phytopatology**, v. 57, p. 69-72, 1967.

GUERRERO-BELTRÁN, J.A.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V.; SWANSON, B.G. High Hydrostatic Pressure Processing of Fruit and Vegetable Products **Food Reviews International**, v. 21, n. 4, p. 411-425, 2005a.

GUERRERO-BELTRÁN, J.A.; SWANSON, B.G.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V., Shelf life of HHP-Processed peach puree with antibrowning agents **Journal of Food Quality**, v. 28, n. 5-6, p. 479-491, 2005b.

GUERRERO-BELTRÁN, J.A.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V.; MORAGA-BALLESTEROS, G.; MORAGA-BALLESTEROS, M.J.; SWANSON, B.G., Effect of pH and ascorbic acid on high hydrostatic pressure processed mango puree **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 30, n. 5, p. 582-596, 2006.

LOPEZ-MALO, A.; PALOU, E.; BARBOSA-CANOVAS, G.V.; WELTI-CHANES, J.; SWANSON, B. Polyphenoloxidase activity and color changes during storage of high hydrostatic pressure treated avocado puree **Food Research International**, v. 31, n. 8, p. 549-556, 1998.

PONTING, J.D.; JOSLYN, M.A. Ascorbic Acid Oxidation and browning in apple tissue extracts. **Arch. Biochem.**, v. 19, p.47-63, 1948.

QUAGLIA, G.B.; GRAVINA, R.; PAPERI, R.; PAOLETTI, F. Effect of High Pressure Treatments on Peroxidase Activity, Ascorbic Acid Content and Texture in Green Peas **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, v. 29, n. 5/6, p. 552-555, 1996.

WEEMAES, C.; LUDIKHUYZE, L.; BROECK, I. VAN DEN; HENDRICKX, M. High Pressure Inactivation of Polyphenoloxidases **Journal of Food Science**, v. 63, n. 5, p. 873-877, 1998.

WUYTACK, E.Y.; DIELS, A.M.J.; MICHIELS, C.W. Bacterial inactivation by high-pressure homogenisation and high hydrostatic pressure **International Journal of Food Microbiology**, v. 77, n.3, p. 205-212, 2002.

## **ESTUDO 2 – Resistência do *Lactobacillus fructivorans* ao processo de homogeneização a ultra alta pressão**

### **1 Introdução**

Um dos principais objetivos dos tratamentos térmicos, tradicionalmente utilizados na conservação dos alimentos, é a eliminação de microrganismos patogênicos ou deterioradores. Este tipo de tratamento apresenta grande eficiência na destruição de quase todos os microrganismos deste tipo presentes nos alimentos, porém a sua aplicação torna-se cada vez mais indesejada devido às alterações sensoriais e nutricionais que são consequências de seu uso.

Neste cenário, diversos tratamentos que substituam os tratamentos térmicos tradicionais ou que possam complementar tratamentos térmicos mais brandos têm sido estudados. Como exemplos destes tratamentos, podemos citar, dentre outros, os tratamentos a alta pressão (isostático ou de homogeneização), os de pulso elétrico e o uso da radiação.

A água de coco, embora seja uma solução naturalmente estéril, pode ser contaminada no processo de extração por microrganismos que se desenvolvem facilmente neste meio, que dispõe de todos os nutrientes necessários para isto (água, açúcares e proteína) em quantidade suficiente, além de possuir em sua composição alguns fatores de crescimento, que facilitam ainda mais o crescimento dos microrganismos. Devido às suas características nutricionais a água de coco chega a ser usada como meio de cultura em laboratórios de análises microbiológicas.

Os principais microrganismos que podem contaminar o produto são bolores, leveduras e bactérias presentes no ambiente ou na flora natural do ser humano, já que a contaminação se dá pelo contato do produto com o próprio ambiente, com equipamentos contaminados ou com as pessoas que manipulam o produto durante o processo de produção. A eficácia do tratamento de alta pressão para eliminação de muitos destes microrganismos já foi comprovada por alguns estudos feitos com outros produtos.

A tecnologia de ultra-alta pressão tem se mostrado eficiente na eliminação de alguns microrganismos contaminantes de alimentos.

BARBOSA-CANOVAS (1997) mostra a viabilidade da aplicação de alta pressão para a eliminação de diversos microrganismos. *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Sacharomyces cerevisiae*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus aureus*, *Streptococcus lactis*, *Vibrio cholera*, entre outros, sofreram reduções logarítmicas quando submetidos a tratamento de alta pressão com pressões, temperaturas e tempos variados, havendo esterilização em alguns casos.

Segundo SMELT (1998), os microrganismos mais resistentes aos tratamentos térmicos, em geral, também são mais resistentes ao tratamento sob alta pressão, embora haja exceções. As bactérias Gram-positivas apresentam maior resistência do que as Gram-negativas.

Pelo método isostático, tem-se que: fungos e leveduras são inativados por pressões entre 200 e 300 MPa, bactérias são inativadas por tratamentos de 300 a 600 MPa. A maioria dos esporos de fungos e leveduras são inativados por pressões próximas a 400 MPa. No entanto, há esporos bacterianos que resistem a pressões maiores que 1000 MPa. Assim, o uso da pressão é uma alternativa potencial à pasteurização por aquecimento, pois a pressão mantém as moléculas pequenas assim como muitos compostos de sabor e as vitaminas intactos (SMELT, 1998).

GOULD (1996) também cita que, com respeito à sensibilidade à pressão dos microrganismos, uma divisão importante é aquela entre as formas vegetativa e esporulada das bactérias. Enquanto inúmeros fatores ambientais afetam a tolerância à pressão, em particular a atividade de água, geralmente as formas vegetativas ainda mantidas são inativadas por pressões na região de 300 a 500 MPa, mas esporos de várias espécies resistem bem a pressões de até 1000 MPa (método isostático). Por esta razão, a aplicação mais comum da tecnologia de alta pressão na preservação de alimentos é em produtos de baixo pH ou refrigerados, nos quais esporos não são problema porque, mesmo que sobrevivam, estarão incapacitados para reprodução (GOULD, 1996).

Até este estudo, não se tem conhecimento de pesquisas realizadas a respeito da resistência do *Lactobacillus fructivorans* aos tratamentos de alta pressão. Estes dados são importantes, já que os microrganismos do gênero *Lactobacillus* são encontrados freqüentemente como contaminantes de diversos produtos alimentícios, e em produtos derivados de frutas, em especial.

## **2 Objetivos**

O objetivo deste trabalho foi avaliar a resistência dos microrganismos da espécie *Lactobacillus fructivorans* ao tratamento de homogeneização UAP aplicado em água de coco e foi realizado em duas etapas.

A primeira parte teve como objetivo a produção de uma curva de inativação desta bactéria de acordo com as pressões aplicadas ao produto, variando de 50 a 300 MPa.

Na segunda etapa, estudou-se a influência do pH do produto e da pressão de processo na inativação do microrganismo, através da realização de um planejamento experimental completo.

### **3 Material e Métodos**

#### **3.1 Equipamento**

O processamento HUAP foi realizado no equipamento nG7400H:320, fabricado pela Stansted Fluid Power (Stansted, Inglaterra), que atinge pressões de até 320 MPa. O equipamento possui um sistema de dois pistões, que trabalham sincronizados e alternadamente, de forma a manter a pressão de processo estável e contínua durante o processamento.

Um sistema de alimentação composto de duas válvulas foi acoplado antes da entrada do produto no equipamento, permitindo alternar a entrada do produto de dois diferentes recipientes. Um dos recipientes continha água destilada, e o outro água de coco, de forma a permitir o trabalho alternado entre os dois produtos sem a necessidade de pausar o processamento.

Na saída do equipamento, havia um pequeno trocador de calor tubular que trabalhava com água corrente como meio de resfriamento, permitindo a redução da temperatura do produto até cerca de 30°C. Na saída deste trocador, foi acoplada uma serpentina de inox, que foi imersa em banho de gelo, para permitir o resfriamento do produto até cerca de 5°C.

Após a saída da serpentina, o produto foi levado até um sistema de enchimento composto por uma válvula de três vias com duas saídas (uma para enchimento e uma para descarte). O sistema de enchimento foi montado dentro de uma cabine de fluxo laminar (esterilizada com o uso de uma lâmpada Ultravioleta) para permitir o envase asséptico do produto.

#### **3.2 Água de Coco**

Os cocos verdes utilizados (*Cocos nucifera*) foram obtidos junto ao CEASA/Campinas nas datas dos ensaios. O estágio de maturação dos frutos não foi controlado.

Os frutos foram lavados em água corrente em um tanque de aço e posteriormente sanitizados em água clorada (5ppm de cloro). Antes da extração da água foram refrigerados (2°C) e então perfurados um a um, utilizando um perfurador manual (Figura 1.1). Após a extração, a água foi filtrada em filtro de café (Melitta 103) para eliminação de partículas maiores (principalmente restos de fibras da casca) e esterilizada em autoclave por 15 minutos a 121°C.

Após a esterilização, a água foi novamente refrigerada, até 10°C e o pH foi ajustado para 5,3 com solução de ácido cítrico 0,1M ou hidróxido de sódio 0,1N. A temperatura de entrada do produto no equipamento foi ajustada para 10°C, e a porcentagem de sólidos solúveis mantida em 5,0°B. Como todas as extrações apresentaram percentual de sólidos solúveis de 5,0°B, não foram necessários ajustes.

Antes do processamento a água de coco foi inoculada com um caldo MRS inoculado com cultura de *Lactobacillus fructivorans*, preparado anteriormente, conforme descrito no item a seguir. O caldo foi adicionado à água de coco na proporção de 1%.

O fato de todas as mesclas de águas de coco terem apresentado o mesmo teor de sólidos solúveis indica que os cocos utilizados estavam em estágios de maturação semelhantes, já que esta o teor de sólidos solúveis da água de coco se altera durante a maturação do fruto.

Para o planejamento experimental, o pH foi ajustado para os valores determinados em cada ensaio.

### **3.3 Cultura de Microrganismos**

A cultura de microrganismos utilizada foi adquirida junto à Fundação André Tosello de Culturas Tropicais. Os microrganismos foram isolados de caldo de cana e identificados como da espécie *Lactobacillus fructivorans*, sendo posteriormente liofilizados e estocados em temperatura de congelamento e em seguida reativados em MRS ágar.

As culturas foram utilizadas para inocular frascos contendo 50 mL de MRS ágar, que foram congelados. No dia anterior ao processamento, os frascos eram descongelados e incubados por um período de 20 h a 35°C, possibilitando o crescimento da cultura até um nível entre  $10^9$  e  $10^{10}$  UFC/mL.

### 3.4 Processamento

O processo era iniciado utilizando água destilada para eliminar o ar do sistema e estabilizar a pressão de processo. Alcançado o regime, o equipamento era alimentado com a água de coco previamente inoculada. Utilizando-se o sistema de válvulas instalado na entrada do equipamento, pode-se alternar a alimentação entre água destilada e água de coco sem necessidade de pausar o processamento.

A água de coco foi bombeada através da válvula de homogeneização, ajustando as pressões para 50, 100, 150, 200, 250 e 300 MPa. O equipamento permite uma vazão de cerca de 270mL por minuto para o produto.

Após o processamento, o produto foi rapidamente refrigerado até 5°C, utilizando-se o trocador de calor e a serpentina imersa em banho de gelo, de forma a evitar influências da temperatura nos resultados. Após a refrigeração, o produto foi coletado dentro da cabine de fluxo laminar em tubos de ensaio previamente esterilizados. As amostras, processadas e não-processadas, foram então analisadas quanto à contagem de *Lactobacillus*.

O estudo foi realizado em duplicata.

Para os ensaios do planejamento experimental, as pressões utilizadas foram as determinadas para cada ensaio, assim como o pH da água de coco, que foi ajustado para o valor de estudo utilizando-se solução de ácido cítrico ou hidróxido de sódio. O restante do procedimento foi idêntico ao realizado para o primeiro estudo.

Após cada processamento, o sistema foi enxaguado com água destilada por cerca de 10 minutos e em seguida preenchido com etanol a 70% (v/v), permanecendo inundado pelo álcool por um período de pelo menos 24h.

As temperaturas do produto foram medidas na entrada (termômetro de mercúrio) e após a válvula de homogeneização, na entrada e na saída do trocador de calor com termopares tipo T acoplados a um aquisitor de dados (Barnat Company – 12 Channel Scanning Thermocouple Thermometer).



### **3.5 Contagem Microbiológica**

As amostras foram analisadas quanto ao número de *Lactobacillus* de acordo com o método descrito por VANDERZANT (1992) para contagem de bactérias lácticas – contagem em profundidade em meio MRS agar (de Man, Rogosa e Sharpe).

### **3.6 Análises Físico-Químicas**

- pH (A.O.A.C. nº 42.1.04 Official Method nº 981.12 (1997));
- Sólidos Solúveis (A.O.A.C. nº 37.1.15 Official Method nº 932.12 (1997));

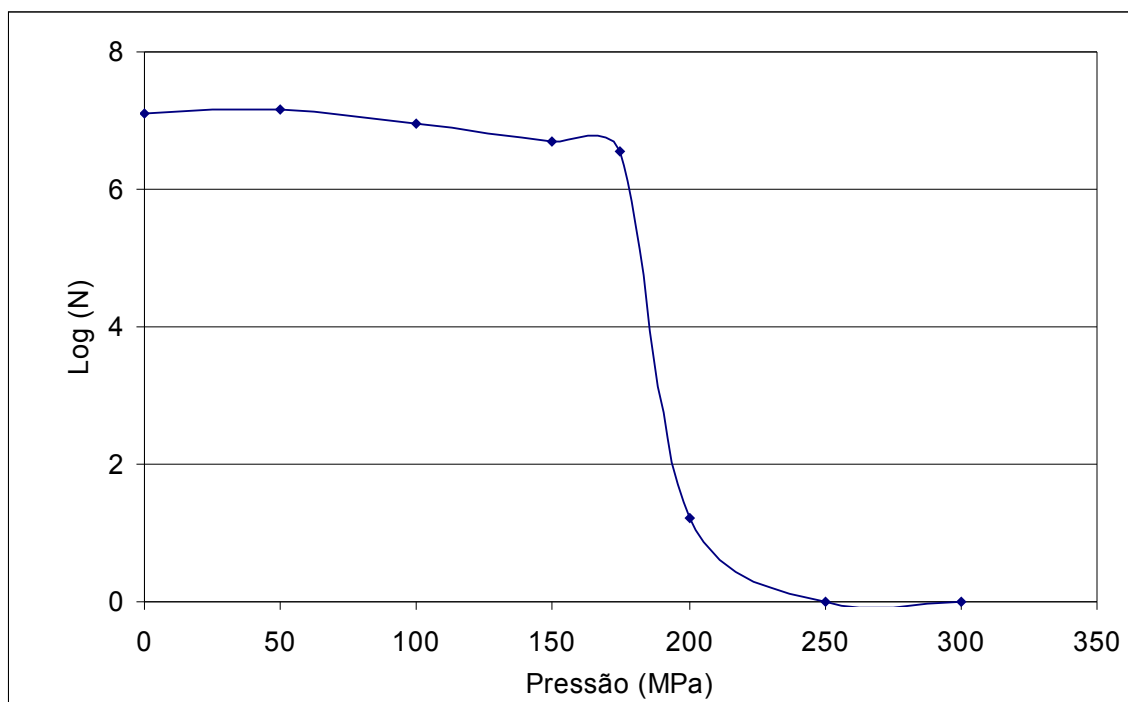
#### 4 Resultados e Discussões

A Tabela 2.1 mostra os resultados obtidos nos processamentos realizados para construção da curva de destruição dos *Lactobacillus fructivorans* em função da pressão de processo (Figura 2.1).

**Tabela 2.1 – Efeito do processamento a Ultra Alta pressão na inativação de *Lactobacillus fructivorans***

Pressão (MPa)	Contagem (UFC/mL)		Log (N/N <sub>0</sub> )		Log (N/N <sub>0</sub> )	
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 1	Ensaio 2	Média	DP
Sem Tratamento	1,3x10 <sup>7</sup>	2,0 x10 <sup>7</sup>	0	0	0	0
50	1,4x10 <sup>7</sup>	2,2 x10 <sup>7</sup>	0	0	0	0
100	9,2 x10 <sup>6</sup>	1,3 x10 <sup>7</sup>	0,14	0,18	0,16	0,03
150	4,8 x10 <sup>6</sup>	5,8 x10 <sup>6</sup>	0,42	0,53	0,48	0,08
175	3,5 x10 <sup>6</sup>	N.R.**	0,56	N.R.	0,56	-
200	16	<1	5,92	>7,29	6,60	0,97
250	<1	<1	>7,11	>7,29	7,20	0,13
300	<1	<1	>7,11	>7,29	7,20	0,13

N.R.\*\* – ensaio não realizado neste valor de pressão



**Figura 2.1 – Modelo de curva de inativação do *Lactobacillus fructivorans* em função da pressão de processo (relativa ao ensaio 1)**

A observação da curva de destruição microbológica (Figura 2.1) indica que tratamentos abaixo de 175 MPa são pouco eficientes na destruição dos *Lactobacillus fructivorans*, causando menos de uma redução logarítmica. No entanto, tratamentos em pressões de 200 MPa ou acima foram altamente eficientes, causando mais de 6 reduções logarítmicas no número de microrganismos. Os quatro ensaios realizados nas maiores pressões (dois tratamentos a 250 MPa e dois a 300 MPa) reduziram a contagem de microrganismos para zero no produto processado, ou seja, eliminaram todos os microrganismos presentes no mesmo. O número inicial de colônias no produto foi de aproximadamente  $10^7$  UFC/mL.

WUYTACK et al. (2002) estudou a eliminação do *Lactobacillus plantarum* inoculado em tampão fosfato utilizando o mesmo processo HUAP e obteve uma resistência muito maior das células, não chegando a alcançar mais de uma redução logarítmica pelo tratamento a 300 MPa. Outros gêneros de microrganismos, submetidos ao mesmo tipo de tratamento foram eliminados mais facilmente neste mesmo estudo, principalmente as bactérias Gram negativas.

Com o objetivo de analisar o efeito da pressão de processo e do pH do produto realizou-se o planejamento experimental, onde estudou-se pressões de 80 a 220 MPa e pH de 4,5 a 6,0. Os valores das variáveis utilizados são apresentados na Tabela 2.2.

**Tabela 2.2 – Valores das variáveis independentes utilizadas no planejamento experimental.**

Variável	$-\sqrt{2}$	-1	0	+1	$+\sqrt{2}$
Pressão (MPa)	80	100	150	200	220
PH	4,50	4,72	5,25	5,78	6,00

Com estas variáveis, foram realizados 11 ensaios. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 2.3.

**Tabela 2.3 – Resultados dos ensaios realizados na etapa de planejamento experimental**

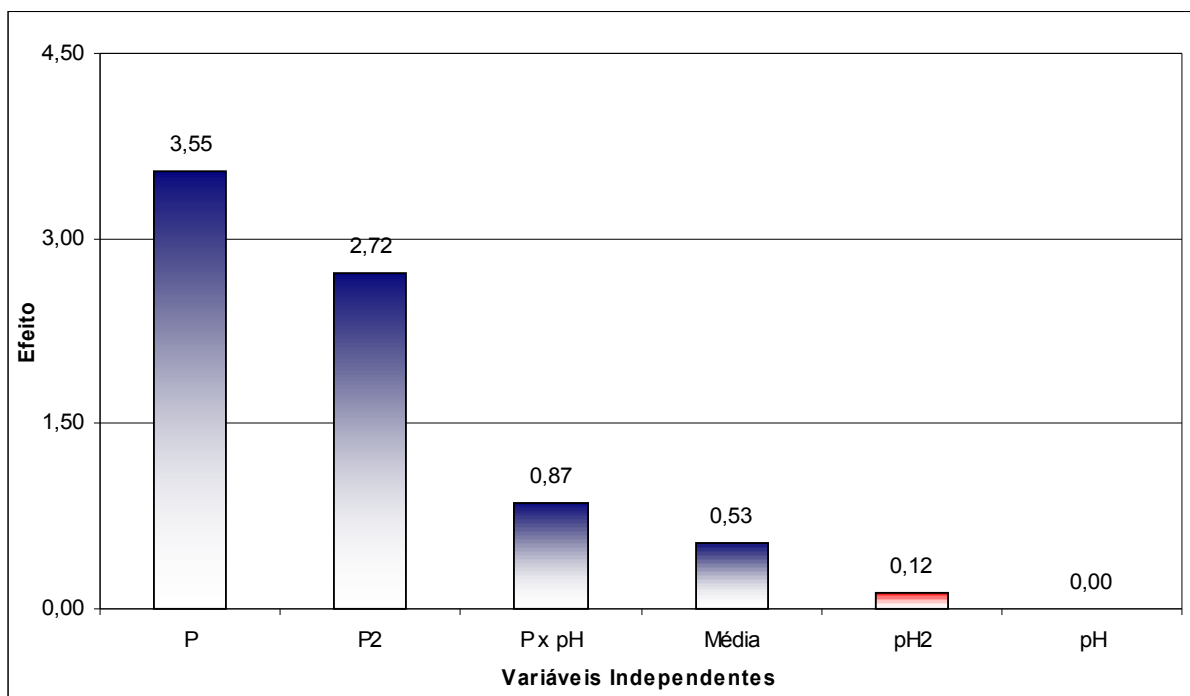
Ensaio	P (MPa)	pH	Log (N/N <sub>0</sub> )
1	150	4,50	0,50
2	100	4,72	0,87
3	200	4,72	2,63
4	80	5,25	0,14
5	150	5,25	0,65
6	150	5,25	0,42
7	150	5,25	0,53
8	220	5,25	6,46
9	100	5,78	0,06
10	200	5,78	3,55
11	150	6,00	0,42

A Tabela 2.4 apresenta os efeitos primário e secundário de cada uma das variáveis, assim como o efeito da interação entre as duas variáveis. Esta análise é apresentada na Figura 2.2 através do gráfico de pareto abaixo. Os valores dos efeitos são apresentados na Tabela 2.4.

**Tabela 2.4 – Análise dos efeitos da pressão de processo e do pH no número de reduções logarítmicas**

MS Erro Puro=0,0132333 ; R <sup>2</sup> =0,95548				
	Efeito	DP (Erro Puro)	t(2)	P
Média	0,533335	0,066416	8,03019	0,015156
P	3,54697	0,081343	43,60495	0,000526
P <sup>2</sup>	2,715455	0,096819	28,04681	0,001269
<b>*pH</b>	<b>-0,00078</b>	<b>0,081343</b>	<b>-0,00964</b>	<b>0,993185</b>
<b>*pH<sup>2</sup></b>	<b>-0,1246</b>	<b>0,096819</b>	<b>-1,28694</b>	<b>0,326957</b>
PxpH	0,865	0,115036	7,51937	0,017231

\*valores em negrito indicam efeito não significativo ( $p < 0,10$ )

**Figura 2.2 – Gráfico de Pareto dos efeitos de P e pH no número de reduções logarítmicas de *Lactobacillus fructivorans***

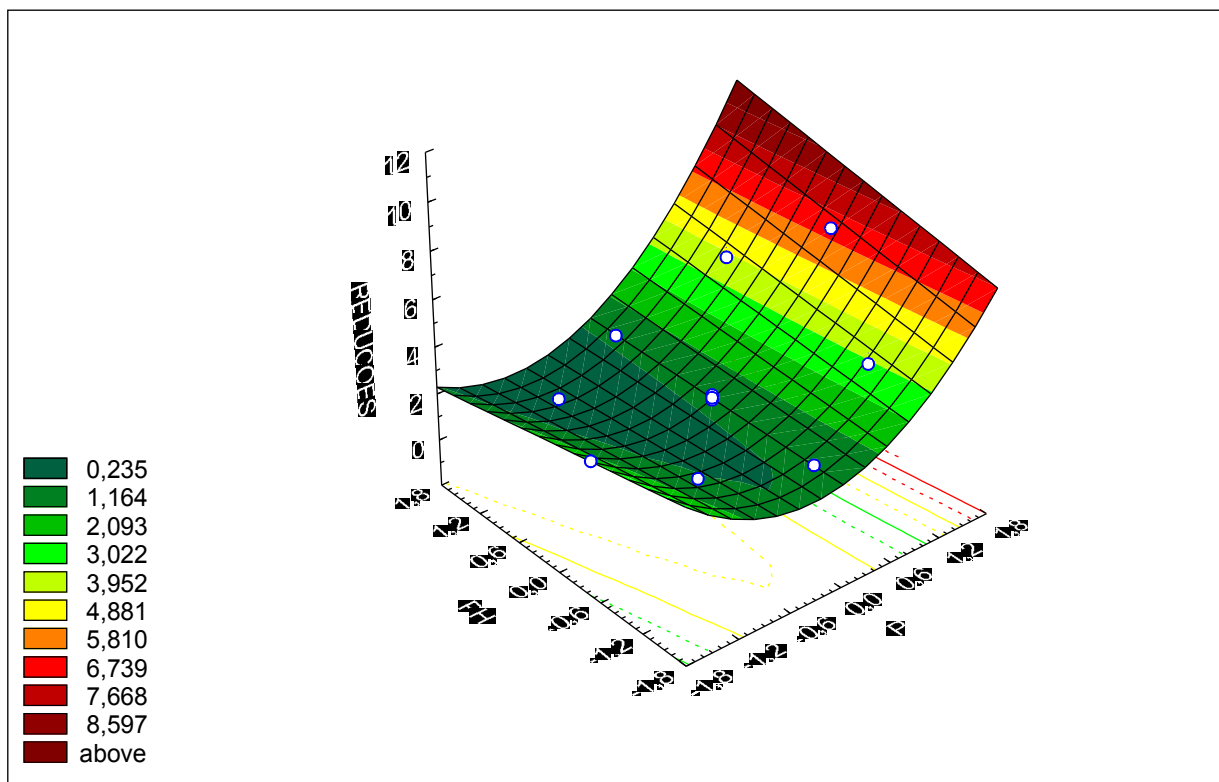
Analisando os efeitos com um nível de significância de 90% ( $p < 0,10$ ), nota-se uma forte influência da pressão no resultado dos experimentos. O aumento da pressão apresenta

um efeito positivo no número de reduções logarítmicas. O efeito do pH é negativo, mas não significativo. A interação entre a pressão e o pH apresenta um efeito significativo e positivo.

Ignorando os efeitos do pH, que não são significativos, podemos gerar um modelo experimental que permite prever o número de reduções logarítmicas das células de *Lactobacillus fructivorans* em função do pH da água de coco e da pressão de processo. Os coeficientes calculados são apresentados na Tabela 2.5. O modelo pode ser ilustrado pela sua função ou pela superfície de resposta (Figura 2.3).

**Tabela 2.5 - Coeficientes do modelo: número de reduções logarítmicas em função da pressão e pH**

MS Erro Puro=0,0132333 ; R <sup>2</sup> =0,95548				
	Coef. Regr.	DP (Erro Puro)	t(2)	P
<b>Média</b>	0,4747	0,048325	9,823074	0,010205
<b>P</b>	1,773485	0,040672	43,60495	0,000526
<b>P<sup>2</sup></b>	1,37605	0,046268	29,74068	0,001129
<b>*PxPH</b>	0,4325	0,057518	7,51937	0,017231



**Figura 2.3 – Superfície de resposta: número de reduções logarítmicas em função do pH do produto e da pressão de processo**

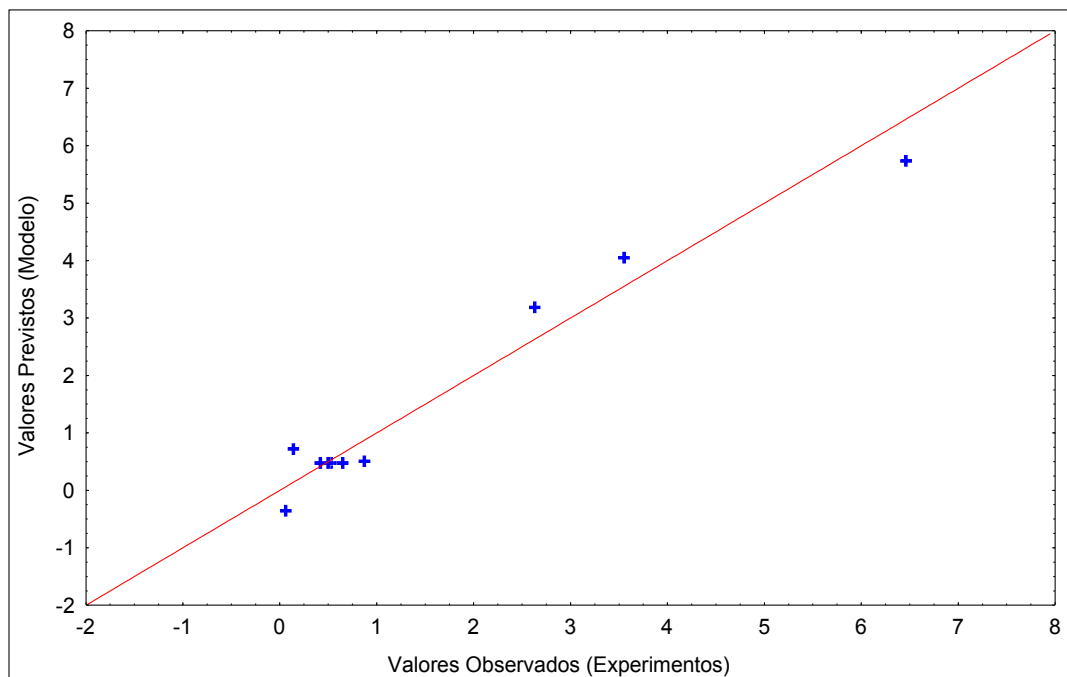
Esta superfície é matematicamente descrita pelo modelo a seguir, que utiliza os valores de pressão e pH codificados conforme a Tabela 2.2.

$$\text{Log (N/N}_0\text{)} = 0,533 + 1,773 P + 1,358 P^2 - 0,0623 \text{ pH}^2 + 0,4325 P \text{ pH}$$

Analisando a superfície de resposta, verifica-se que a pressão exerce influência maior do que o pH na inativação do microrganismo. Processos que utilizarem pressões mais elevadas estarão mais propensos a causar a morte de maior número de células.

O pH exerce menor influência, acentuando-se quando se utilizam pressões mais elevadas. Nestes casos, valores de pH maiores permitem um maior número de reduções logarítmicas ocasionadas por processamentos com o mesmo nível de pressão.

A Figura 2.4 ilustra o desvio dos resultados previstos e observados experimentalmente. Pontos mais próximos da reta indicam valores experimentais mais semelhantes aos valores previstos pelo modelo.



**Figura 2.4 – Valores previstos e observados do número de reduções logarítmicas das células de *Lactobacillus fructivorans***

Os pontos não estão muito distantes da reta, o que indica que o modelo representa adequadamente os resultados obtidos na prática. Isto é comprovado pela análise de variância do modelo, e pelo teste F, que indica que este é preditivo, já que o valor de F calculado é cerca de 16 vezes maior do que o valor de F tabelado (Tabela 2.6).

**Tabela 2.6 – Análise de variância do modelo**

Análise de Variância	SQ	GL	MQ	Fcalc	Ftab	Fc/Ft
<b>Regressão</b>	37,61	3,00	12,54	49,43	3,07	16,10
<b>Resíduos</b>	1,78	7,00	0,25			
<b>Falta de Ajuste</b>	1,75	5,00	0,35	26,44		
<b>Erro Puro</b>	0,03	2,00	0,01			
<b>Total</b>	39,39	10,00				



## 5 Conclusões

O estudo demonstrou que o tratamento a alta pressão é eficaz na inativação do *Lactobacillus fructivorans*. A aplicação de tratamentos em pressões a partir de 250 MPa no produto é capaz de causar mais de sete reduções logarítmicas no número de células deste microrganismo em água de coco.

O planejamento experimental mostrou que o valor do pH exerce influência muito menor do que a pressão de processo na destruição dos *Lactobacillus fructivorans*. Foi possível obter um modelo preditivo que relaciona o número de reduções logarítmicas ao pH do produto e à pressão utilizada no processamento.

Para valores de pressões extremos (muito altos ou muito baixos), a influência do pH é um pouco maior, sendo que em altas pressões (próximas a 300 MPa), o processamento mostrou-se mais efetivo na destruição dos microrganismos quando utilizado em produtos com pH mais elevado. Para pressões baixas, o efeito é inverso, ou seja, pHs menores permitem maior efetividade do processamento.

## 6 Bibliografia

BARBOSA-CANOVAS, G.V.; POTHAKAMURY, U.R.; PALOU, E.; SWANSON, B.G. **Nonthermal Preservation of Foods**. 1.ed. New York: Marcel Decker, 1997. 276p.

BRUNS, R.E.; BARROS NETO, B.; SCARMINIO, J.S. **Planejamento e Otimização de Experimentos**. 2.ed. Campinas: Editora da Unicamp, 1995. 299 p.

CAMPOS, C.F.; SOUZA, P.E.A., COELHO, J.V.; GLORIA, M.B.A. Chemical Composition, Enzyme Activity and Effect of Enzyme Inactivation on Flavor Quality of Green Coconut Water **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 20, n 26, p. 487-500, 1996

CHEFTEL, J.C. Review: High-pressure, microbial inactivation and food preservation **Food Science and Technology International**, 1(2/3):75-90, 1995.

GOULD, G.W. Methods for preservation and extension of shelf life. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 33, n. 1, p. 51-64, 1996. Elsevier Science

POPPER, L; KNORR, D. Application of High-Pressure Homogenization for Food Preservation **Food Technology**, 43(7):86-90, 1990.

SMELT, J.P.P. Recent advances in the microbiology of high pressure processing. **Trends in Food Science & Technology**, Oxford, v. 9, n: 4, p. 152-158, 1998.

VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D.F. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3 ed. Washington: American Public Health Association, 1992. 1219 p.

WUYTACK, E.Y.; DIELS, A.M.J.; MICHIELS, C.W. Bacterial inactivation by high-pressure homogenisation and high hydrostatic pressure **International Journal of Food Microbiology**, v. 77, n.3, p. 205-212, 2002.

### **ESTUDO 3 - Resistência de *Saccharomyces cerevisiae* ao processo de homogeneização a ultra alta pressão**

#### **1 Introdução**

Com o atual interesse dos consumidores em produtos cada vez mais próximos aos naturais vários métodos têm surgido para tentar substituir os tradicionais tratamentos térmicos, que alteram o sabor e as características nutricionais dos alimentos. Um destes métodos é o tratamento de homogeneização a alta pressão, onde produtos líquidos são bombeados com pressões bastante elevadas (em torno de 300 MPa) através de uma válvula de homogeneização, onde há uma brusca queda de pressão até a pressão atmosférica. Este tratamento já se mostrou, em diversos estudos, eficiente na eliminação de vários tipos de microrganismos (BARBOSA-CANOVAS, 1997).

Segundo SMELT (1998), os microrganismos mais resistentes aos tratamentos térmicos, em geral, também são mais resistentes ao tratamento sob alta pressão. Bolores e leveduras mostram-se particularmente mais sensíveis a este tipo de tratamento, podendo ser inativados por tratamentos de 200 a 300 MPa pelo método de alta pressão isostática.

Ainda pelo método isostático, pressões entre 300 e 600 MPa podem inativar leveduras, mofo e a maioria das células vegetativas de bactérias incluindo a maioria dos patógenos infecciosos presentes nos alimentos. Assim, o uso da pressão é uma alternativa potencial à pasteurização por aquecimento, pois a pressão mantém as moléculas pequenas assim como muitos compostos de sabor e as vitaminas intactos. A maioria dos esporos de fungos e leveduras são inativados por pressões próximas a 400 MPa. No entanto, há esporos bacterianos que resistem a pressões maiores que 1000 MPa (SMELT, 1998).

Os principais microrganismos que podem contaminar a água de coco são bolores, leveduras e bactérias presentes no ambiente ou na flora natural do ser humano, já que a contaminação se dá pelo contato do produto com o próprio ambiente, com equipamentos contaminados ou com as pessoas que manipulam o produto durante o processamento.

Para estudar a eliminação de uma possível contaminação da água de coco por leveduras, escolheu-se a *Sacharomyces cerevisiae* como um microrganismo representativo. A revisão técnica do IFT sobre tratamentos de alta pressão sugere a *Sacharomyces cerevisiae* como microrganismo para estudo da destruição de leveduras através deste método.

Os estudos já realizados com esta levedura em tratamentos de alta pressão isostáticos demonstram que a resistência do microrganismo a este tipo de tratamento não é alta.

OGAWA et al. (1990) conseguiu eliminar totalmente contaminações de  $10^5$ UFC/mL de levedura utilizando o tratamento isostático a pressões de 300 e 400 MPa, não tendo observado influência do pH do meio na eliminação dos microrganismos. HASHIZUME et al. (1995) alcançou até sete reduções logarítmicas no número de células de *Saccharomyces cerevisiae* pelo método isostático, utilizando pressões de até 270 MPa.

PARISH (1998) apresentou parâmetros de inativação da *Saccharomyces cerevisiae* pelo processo de alta pressão isostática em suco de laranja pasteurizado. Os valores do parâmetro D variaram de 1 a 38 segundos a pressões de 500 a 350 MPa para as células vegetativas. Ascósporos apresentaram maior resistência, tendo valor de D entre 4 e 76s.

Embora as pesquisas em tecnologia de altas pressões isostáticas estejam bastante avançadas, os estudos com processos contínuos (homogeneização) ainda são escassos. Estes processos podem permitir maior volume de produção aos processadores de alimentos líquidos.

## **2 Objetivos**

O objetivo deste trabalho foi avaliar a resistência de *Sacharomyces cerevisiae* ao tratamento HUAP aplicado em água de coco. O estudo foi realizado em duas etapas.

A primeira parte teve como objetivo a produção de uma curva de destruição desta levedura de acordo com as pressões aplicadas ao produto, variando de 50 a 300 MPa.

Na segunda etapa, estudou-se a influência do pH do produto e da pressão de processo na morte dos microrganismos, através da realização de um planejamento experimental completo. O pH foi estudado na faixa de 4,5 a 6,0, enquanto o valor da pressão variou de 100 a 300 MPa.

### **3 Material e Métodos**

#### **3.1 Equipamento**

O processamento HUAP foi realizado no equipamento nG7400H:320, fabricado pela Stansted Fluid Power (Stansted, Inglaterra), que atinge pressões de até 320 MPa. O equipamento possui um sistema de dois pistões, que trabalham sincronizados e alternadamente, de forma a manter a pressão de processo estável e contínua durante o processamento.

Um sistema de alimentação composto de duas válvulas foi acoplado antes da entrada do produto no equipamento, permitindo alternar a entrada do produto de dois diferentes recipientes. Um dos recipientes continha água destilada e o outro água de coco, de forma a permitir o trabalho alternado entre os dois produtos sem a necessidade de pausar o processamento.

Na saída do equipamento, havia um pequeno trocador de calor tubular que trabalhava com água corrente como meio de resfriamento, permitindo a redução da temperatura do produto até cerca de 30°C. Na saída deste trocador, foi acoplada uma serpentina de inox, que foi imersa em banho de gelo, para permitir o resfriamento do produto até cerca de 5°C.

Após a saída da serpentina, o produto entrava em um sistema de enchimento composto por uma válvula de três vias com duas saídas (uma para enchimento e uma para descarte). O sistema de enchimento foi montado dentro de uma cabine de fluxo laminar (esterilizada com o uso de uma lâmpada Ultravioleta) para permitir o envase asséptico do produto.

#### **3.2 Água de Coco**

Os cocos verdes utilizados (*Cocos nucifera*) foram obtidos junto ao CEASA/Campinas nas datas dos ensaios. O estágio de maturação dos frutos não foi controlado.

Os frutos foram lavados em água corrente em um tanque de aço e posteriormente sanitizados em água clorada (5ppm de cloro). Antes da extração da água foram refrigerados (2°C) e então perfurados um a um, utilizando um perfurador manual (Figura 1.1). Após a extração, a água foi filtrada em filtro de café (Melitta 103) para eliminação de partículas maiores (principalmente restos de fibras da casca) e esterilizada em autoclave por 15 minutos a 121°C.

Após a esterilização, a água foi novamente refrigerada, até 10°C e o pH foi ajustado para 5,3 com solução de ácido cítrico 0,1M ou hidróxido de sódio 0,1N. A temperatura de entrada do produto no equipamento foi ajustada para 10°C, e a porcentagem de sólidos solúveis mantida em 5,0°B. Como todas as extrações apresentaram percentual de sólidos solúveis de 5,0°B, não foram necessários ajustes.

Antes do processamento a água de coco foi inoculada com um caldo MRS contendo cultura de *Saccharomyces cerevisiae*, preparado anteriormente, conforme descrito no item a seguir. O caldo foi adicionado à água de coco na proporção de 1%.

O fato de todas as mesclas de águas de coco terem apresentado o mesmo teor de sólidos solúveis indica que os cocos utilizados estavam em estágios de maturação semelhantes, já que esta o teor de sólidos solúveis da água de coco se altera durante a maturação do fruto.

Para o planejamento experimental, o pH foi ajustado para os valores determinados em cada ensaio.

### **3.3 Cultura de Microrganismos**

A cultura de microrganismos utilizada foi isolada a partir de uma amostra contaminada de suco de laranja pasteurizado no Laboratório de Termobacteriologia do Departamento de Ciência de Alimentos da FEA/UNICAMP. A cepa isolada foi identificada como *Sacharomyces cerevisiae*.

As culturas foram utilizadas para inocular tubos contendo 50 mL de caldo extrato de malte, que foram incubados por um período de 24 h a 30°C, possibilitando o crescimento da cultura até um nível entre  $10^7$  e  $10^8$  UFC/mL.

### 3.4 Processamento

O processo era iniciado utilizando água destilada para eliminar o ar do sistema e estabilizar a pressão de processo. Alcançado o regime, o equipamento passava a ser alimentado com a água de coco previamente inoculada com a levedura. Utilizando-se o sistema de válvulas instalado na entrada do equipamento, pôde-se alternar a alimentação entre água destilada e água de coco sem necessidade de pausar o processamento.

A água de coco foi bombeada através da válvula de homogeneização, ajustando as pressões para 50, 100, 150, 200, 250 e 300 MPa. O equipamento permite uma vazão de cerca de 270mL por minuto para o produto.

Após o processamento, o produto foi rapidamente refrigerado até 5°C, utilizando-se o trocador de calor e a serpentina imersa em banho de gelo, de forma a evitar influências da temperatura nos resultados. Após a refrigeração, o produto foi coletado dentro da cabine de fluxo laminar em tubos de ensaio previamente esterilizados. As amostras, processadas e não-processadas, foram então analisadas quanto à contagem de bolores e leveduras.

O estudo foi realizado em duplicata.

Para os ensaios do planejamento experimental, as pressões utilizadas foram as determinadas para cada ensaio, assim como o pH da água de coco, que foi ajustado para o valor de estudo utilizando-se solução de ácido cítrico ou hidróxido de sódio. O restante do procedimento foi idêntico ao realizado para o primeiro estudo.

Após cada processamento, o sistema foi enxaguado com água destilada por cerca de 10 minutos e em seguida preenchido com etanol a 70% (v/v), permanecendo inundado pelo álcool por um período de pelo menos 24h.

As temperaturas do produto foram medidas na entrada (termômetro de mercúrio) e após a válvula de homogeneização, na entrada e na saída do trocador de calor com termopares tipo T acoplados a um aquisitor de dados (Barnat Company – 12 Channel Scanning Thermocouple Thermometer).



### **3.5 Contagem Microbiológica**

As amostras foram analisadas quanto ao número de bolores e leveduras de acordo com o método descrito por VANDERZANT (1992) – contagem em superfície em meio PDA (Potato Dextrose Agar).

### **3.6 Análises Físico-Químicas**

- pH (A.O.A.C. nº 42.1.04 Official Method nº 981.12 (1997));
- Sólidos Solúveis (A.O.A.C. nº 37.1.15 Official Method nº 932.12 (1997));

#### 4 Resultados e Discussões

Com os dados obtidos nos ensaios com pH fixo em 5,3 (Tabela 3.1), foi possível construir a curva de inativação da levedura (Figura 3.1).

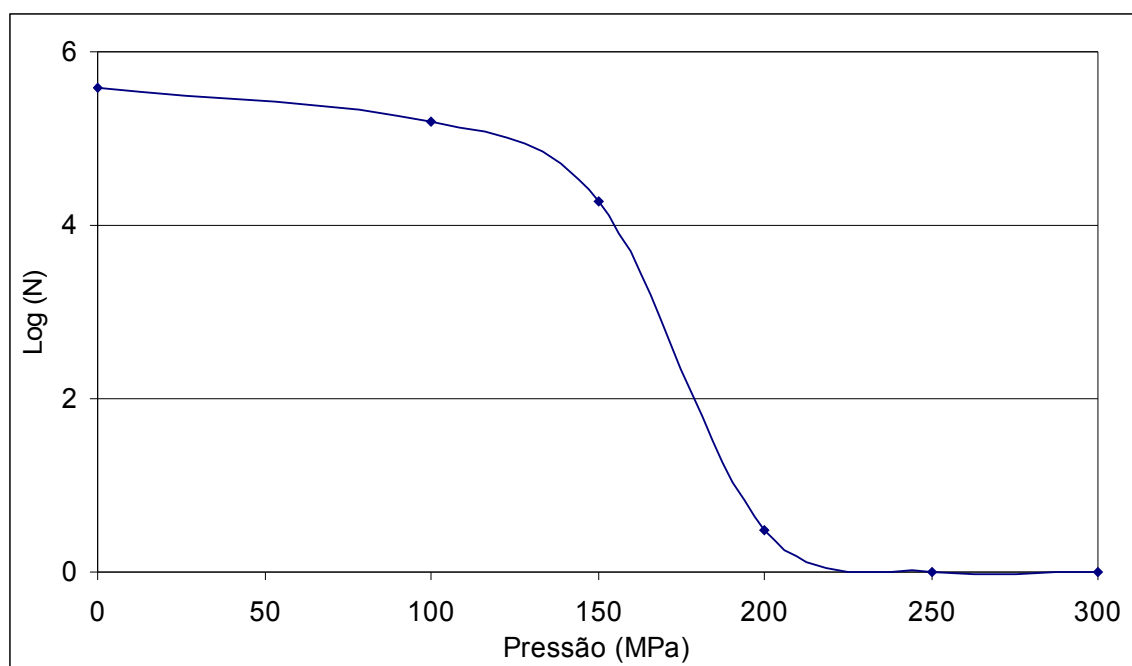
**Tabela 3.1 – Efeito do processamento a Ultra Alta Pressão na inativação de *Sacharomyces cerevisiae***

Pressão (MPa)	Contagem (UFC/mL)		Log (N/No)		Log (N/No)	
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 1	Ensaio 2	Média	DP
Sem Tratamento	4,35x10 <sup>5</sup>	4,00 x10 <sup>5</sup>	0	0	0	0
0	2,85 x10 <sup>5</sup>	3,80 x10 <sup>5</sup>	0,18	0,02	0,10	0,11
100	1,60 x10 <sup>5</sup>	1,60 x10 <sup>5</sup>	0,43	0,40	0,42	0,02
150	1,04 x10 <sup>4</sup>	1,85 x10 <sup>4</sup>	1,62	1,33	1,48	0,21
200	<1	3	>5,64	5,12	5,38	0,37
250	<1	<1	>5,64	>5,60	5,62	0,03
300	<1	<1	>5,64	>5,60	5,62	0,03

O estudo da curva de destruição microbiológica indicou que o número de reduções logarítmicas na contagem de bolores e leveduras está diretamente relacionado ao valor da pressão de processo. Pressões de até 100 MPa foram ineficazes, causando menos de uma redução logarítmica. A partir de 150 MPa, o tratamento passa a mostrar efeito significativo.

Dos seis tratamentos realizados em pressões iguais ou maiores que 200 MPa, cinco foram capazes de eliminar todas as colônias presentes na água de coco inoculada. Em apenas um dos tratamentos a 200 MPa a contagem foi de 3 UFC/mL.

Isto nos permite concluir que tratamentos HUAP utilizando pressões acima de 200 MPa são altamente eficientes na eliminação de leveduras da espécie *Sacharomyces cerevisiae*, alcançando valores superiores a cinco reduções logarítmicas.



**Figura 3.1 – Modelo de curva de inativação da *Saccharomyces cerevisiae* em função da pressão de processo (relativo ao ensaio 2)**

No planejamento experimental, foram estudadas pressões de 0 a 300 MPa e pH de 4,5 a 6,0. Os valores das variáveis utilizados são apresentados na Tabela 3.2. Os resultados obtidos nos 11 ensaios realizados com estas variáveis são apresentados na Tabela 3.3.

**Tabela 3.2 – Valores das variáveis independentes utilizadas no planejamento experimental.**

Variável	$-\sqrt{2}$	-1	0	+1	$+\sqrt{2}$
Pressão (MPa)	100	130	200	270	300
pH	4,50	4,72	5,25	5,78	6,00

**Tabela 3.3 – Resultados dos ensaios realizados na etapa de planejamento experimental**

Ensaio	Pressão (MPa)	pH	Carga Inicial (UFC/mL)	Log (N/N <sub>0</sub> )
1	200	4,5	$2,7 \times 10^5$	5,42
2	130	4,72	$2,5 \times 10^5$	4,24
3	270	4,72	$2,5 \times 10^5$	5,39
4	100	5,25	$2,7 \times 10^5$	1,62
5	200	5,25	$2,7 \times 10^5$	5,42
6	200	5,25	$2,7 \times 10^5$	5,42
7	200	5,25	$2,7 \times 10^5$	5,42
8	300	5,25	$2,7 \times 10^5$	5,42
9	130	5,78	$2,5 \times 10^5$	0,90
10	270	5,78	$2,5 \times 10^5$	5,40
11	200	6	$3,3 \times 10^5$	5,51

Analisando-se a Tabela 3.3 podemos observar que em apenas 3 dos 11 ensaios (ensaios 2, 4 e 9) não houve inativação total da carga microbiana inicial. Ou seja, em todos os tratamentos a pressões iguais ou superiores a 200 MPa toda a carga microbiana foi eliminada, independente do pH do produto.

Com isto, oito dos onze ensaios realizados (os que eliminaram totalmente as células vivas de leveduras), que não necessariamente causam o mesmo efeito nas células de leveduras, apresentaram resultados experimentais muito próximos entre si. Com isto, a análise de um modelo estatístico baseado neste planejamento experimental fica comprometida.

Através dos oito ensaios que utilizaram as maiores pressões, conclui-se que o processamento de homogeneização UAP da água de coco a pressões iguais ou maiores do que 200 MPa, em uma ampla faixa de pH (4,5 a 6,0), é extremamente efetivo na eliminação

de células vivas de *Sacharomyces cerevisiae*, causando um número maior do que cinco reduções logarítmicas.

Ao analisar os resultados dos ensaios que utilizaram pressões menores, e não causaram a morte de todas as células de levedura (ensaios número 2, 4 e 9), nota-se que a diminuição do pH do meio favorece a destruição das células de *Sacharomyces cerevisiae* presentes no produto. O número de reduções logarítmicas do ensaio 2 (pH=4,72) foi bastante elevado, mesmo utilizando-se uma pressão de processo relativamente baixa (130MPa). Já no ensaio 9, com o pH do produto mais elevado (5,78), houve uma redução muito pequena no número de células, com a mesma pressão de processo. No ensaio 4, com pressão de processo um pouco menor (100 MPa), e pH intermediário (5,25), o número de reduções foi superior ao do ensaio 9 e inferior ao do ensaio 2.

Um planejamento experimental mais adequado para estudo da influência do pH pode ser realizado utilizando-se uma carga inicial maior de leveduras no produto ou alterando-se a faixa de estudo das pressões para valores inferiores a 200 MPa, de forma que os tratamentos não causem a eliminação de toda a carga inicial de microrganismos.

## 5 Conclusões

O estudo demonstrou que o tratamento em pressão elevada é muito eficaz na destruição das leveduras da espécie *Sacharomyces cerevisiae*. A aplicação de tratamentos a pressões acima de 200 MPa no produto é capaz de causar mais de cinco reduções logarítmicas no número de células deste microrganismo na água de coco.

O planejamento experimental não permitiu um estudo muito detalhado da influência do pH na destruição dos microrganismos, já que a maioria dos tratamentos realizados nesta fase do estudo eliminou todas as células de microrganismos presentes no produto, o que diminui a precisão dos resultados e dificulta a análise dos dados.

Os ensaios do planejamento experimental permitiram observar que há uma tendência de que valores de pH mais ácidos do meio (água de coco) auxiliem na destruição das células das leveduras pelo tratamento HUAP. Para que a influência do pH seja estudada com maior clareza, o estudo deve ser feito utilizando-se valores de pressão menores, para que não haja destruição total dos microrganismos nos ensaios, evitando-se assim repetição de resultados em ensaios diferentes.

## 6 Bibliografia

BARBOSA-CANOVAS, G.V.; POTHAKAMURY, U.R.; PALOU, E.; SWANSON, B.G. **Nonthermal Preservation of Foods**. 1.ed. New York: Marcel Decker, 1997. 276p.

GOULD, G.W. Methods for preservation and extension of shelf life. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 33, n. 1, p. 51-64, 1996. Elsevier Science

HASHIZUME, C.; KIMURA, K.; HAYASHI, R. Kinetic Analysis of Yeast Inactivation by High Pressure Treatment at Low Temperatures. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 59, n. 8, p. 1455-1458, 1995.

OGAWA, H.; FUKUHISA, K.; KUBO, Y.; FUKUMOTO, H. Pressure Inactivation of Yeasts, Molds, and Pectinesterase in Satsuma Mandarin Juice: Effects of Juice Concentration, pH, and Organic Acids, and Comparison with Heat Sanitation. **Agriculture Biology Chemistry** vol. 54, n. 5, p. 1219-1225, 1990.

PARISH, M.E. High Pressure Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae*, endogenous microflora and pectinmethylesterase in orange juice. **Journal of Food Safety**, 18(1):57-65, 1998.

SMELT, J.P.P. Recent advances in the microbiology of high pressure processing. **Trends in Food Science & Technology**, Oxford, v. 9, n: 4, p. 152-158, MES, 1998.

VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D.F. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3 ed. Washington: American Public Health Association, 1992. 1219 p.

## **ESTUDO 4 – Estabilidade da água de coco homogeneizada a ultra alta pressão**

### **1 Introdução**

A tendência na preferência do consumidor é cada vez mais na direção de produtos naturais e saudáveis, e cada vez menos alimentos processados. Em sucos de frutas e vegetais a tendência é na direção de sucos recém extraídos, com gosto fresco e integridade de sabor e vitaminas, o mais próximo possível dos sucos feitos em casa (BIGNON, 1997).

O consumidor cada vez mais busca alimentos que tenham uma estabilidade prolongada, mas que não utilizem aditivos químicos, e que apresentem características organolépticas próximas à dos produtos naturais (não processados), e com funções nutricionais e até nutracêuticas (ou funcionais). Com isto, os tratamentos térmicos podem perder espaço para tratamentos que causem menores alterações organolépticas ou nutricionais aos produtos, já que o uso de altas temperaturas geralmente causa reações indesejadas nos alimentos, como alterações de sabor e perda de características funcionais e nutritivas.

A maior parte das técnicas de preservação de alimentos age primeiramente diminuindo, ou até, inibindo completamente o crescimento de microrganismos no produto. Buscando atender as carências dos consumidores, novas técnicas buscam métodos mais naturais (por exemplo uso da atmosfera modificada, culturas protetoras, bacteriocinas, e outras enzimas). Em contraste às técnicas inibitórias, uma das técnicas mais utilizadas age na inativação dos microrganismos alvo, sendo que a única técnica substancialmente usada atualmente para este propósito (de inativação, ao invés de inibição de crescimento) seja o uso do calor. Entretanto, a maior parte das técnicas emergentes age através de inativação direta, como por exemplo, a irradiação, aplicação de altas pressões, descargas elétricas de alta voltagem, ultra-som ou adição de lisozimas (GOULD, 1996).

Os tratamentos não térmicos que vêm sendo estudados buscam aumentar a estabilidade dos produtos, sem causar as reações indesejadas que podem ocorrer no



caso dos tratamentos térmicos. Desta forma, são esperadas perdas mínimas de nutrientes e vitaminas e alterações de sabor mínimas ou imperceptíveis.

Uma das tecnologias mais inovadoras para processar produtos termosensíveis é o tratamento de pressão, que utiliza pressões extremamente altas para provocar destruição microbiológica e retardar significativamente as taxas de reações enzimáticas. Assim, o processamento a alta pressão oferece uma alternativa para a preservação de sucos de frutas sem alterações sensoriais indesejadas, comumente associadas aos tratamentos térmicos (BASAK & RAMASWAMY, 1996).

O processo HUAP utiliza fundamentalmente um homogeneizador de alta pressão com o intuito de romper as células de microrganismos, princípio largamente utilizado nas aplicações de biotecnologia.

Dois intensificadores de pressão alternam pistões que trabalham produzindo elevadas pressões no produto. A pressão é então reduzida repentinamente até a pressão atmosférica através de uma válvula de homogeneização. Isto produz uma velocidade muita elevada através do orifício. Tanto a pressão, a tensão de cisalhamento quanto a expansão resultante é responsável pela ruptura das células de microrganismos, não afetando as células do alimento e compostos responsáveis pelo sabor e pelas características nutricionais e funcionais dos alimentos.

A pressão só é aplicada ao produto entre o intensificador de pressão e a válvula de homogeneização, o que significa um período de tempo da ordem de alguns décimos de segundo.

Ao passar pela válvula de homogeneização, a velocidade do produto torna-se extremamente alta (podendo alcançar velocidades acima da velocidade do som) e a pressão extremamente baixa, causando a evaporação do fluido, e começando o fenômeno de cavitação (POPPER & KNORR, 1990). Neste momento ocorre ruptura das células de microrganismos.

Atualmente, a água de coco envasada pode ser encontrada no mercado de duas formas diferentes: congelada ou esterilizada. Em geral, não há adição de conservantes ou qualquer tipo de aditivo nos produtos encontrados no mercado.

No caso da água de coco congelada, o produto é simplesmente extraído, pré-resfriado, envasado e congelado, sem passar por nenhum tipo de tratamento térmico. Através deste processo pode-se obter um produto estável por até 4 meses, porém, o produto deve ser mantido a  $-18^{\circ}\text{C}$ , havendo necessidade de um rígido controle da cadeia de frio, além de haver um alto custo para manter o produto a esta temperatura. Depois de descongelado, o produto mantém suas características por até três dias se conservado a  $5^{\circ}\text{C}$ .

No caso da água de coco esterilizada, o produto, depois de extraído, é submetido a tratamento térmico a temperatura ultra-alta (UHT), seguido de envase asséptico em embalagens cartonadas ou garrafas PET, sendo mantido a temperatura ambiente ou refrigerado. Neste caso, há um alto gasto de energia para a realização do processo UHT. No entanto, através deste processo pode-se aumentar a estabilidade do produto para até oito meses, sem a necessidade de refrigeração.

Esses processos buscam eliminar os dois fatores que podem causar deterioração e conseqüente diminuição da estabilidade do produto: a atividade enzimática e a contaminação microbiológica.

Por ser uma bebida cujas características sensoriais são alteradas quando submetida ao tratamento térmico, a conservação da água de coco através do tratamento a alta pressão poderá ser vantajosa. Com isto, deve-se obter um produto com características nutritivas, funcionais e sensoriais mais próximas às naturais, quando comparado ao produto tratado termicamente.

A água de coco é uma solução naturalmente estéril, porém, pode ser contaminada no processo de extração por microrganismos que podem se desenvolver facilmente neste meio, que dispõe de água, açúcares e proteína em quantidade suficiente para isto. Por ser um bom ambiente para o crescimento de microrganismos, a água de coco chega a ser usada em laboratórios de análises microbiológicas como meio de cultura.

A contaminação do produto pode ocorrer pelo contato com ambiente, equipamentos ou operadores. Sendo assim, os principais microrganismos que podem contaminar o produto são bolores, leveduras e bactérias presentes no ambiente de produção. A eficácia do tratamento de alta pressão para eliminação de alguns

microrganismos que poderiam estar presentes na água de coco industrializada já foi comprovada por alguns estudos feitos com outros produtos.

Há duas enzimas que podem causar a deterioração da água de coco: a peroxidase e a polifenoloxidase. Estas enzimas causam oxidação de alguns componentes da água de coco, causando escurecimento do produto. As duas enzimas possuem alta atividade no produto, havendo predominância da atividade da peroxidase.

O pH ótimo para PFO e para a peroxidase constatado foi de 6,0 e 5,5, respectivamente, sendo que o pH da água de coco (5,0 –5,2) mostrou-se favorável para a ação das duas enzimas. A temperatura ótima para a ação das enzimas foi de 25°C e 35°C, respectivamente (CAMPOS, 1996). Alguns estudos feitos com outros produtos demonstram a possibilidade de inativar estas duas enzimas através do uso de alta pressão.

Os estudos realizados neste trabalho indicaram que as duas enzimas presentes na água de coco não são totalmente inativadas pelos tratamentos HUAP. Ao utilizar um tratamento eficaz na destruição de microrganismos mas ineficaz na inativação enzimática, pode-se fazer utilização de um aditivo químico para evitar a atividade enzimática. CAMPOS (1996) sugere o ácido ascórbico e o metabissulfito de potássio como antioxidantes para inibição da atividade enzimática na água de coco.

Após passar pelo processamento, a água de coco, além de ter boa qualidade microbiológica e baixa atividade enzimática, deve apresentar características físico-químicas e sensoriais próximas às do produto natural.

Dentre as características físico-químicas da água de coco, podemos citar: teor de sólidos solúveis (5,0 a 5,5°B), o pH (5,0 a 5,2) e a acidez (110 e 130 mg ác. cítrico/ 100 mL) (CAMPOS, 1996).

Quanto às características sensoriais, o produto não deve sofrer alterações perceptíveis, mantendo sua cor, sabor e aroma naturais, pois o tratamento de homogeneização a alta pressão tem ação eficaz na redução de atividade microbiana e enzimática, enquanto deixa intactos compostos menores, responsáveis pelo sabor e pelos valores nutricionais dos alimentos.

## **2 Objetivos**

O objetivo deste trabalho foi avaliar a estabilidade da água de coco processada através do método de homogeneização a alta pressão.

Foi avaliado também o uso do ácido ascórbico aliado ao tratamento HUAP para diminuição da atividade enzimática da água de coco e melhoria da estabilidade do produto.

Para isto, foi feito um acompanhamento da água de coco processada, adicionada ou não de ácido ascórbico, e armazenada a 10°C.

Foram avaliadas as características físico-químicas, sensoriais, microbiológicas, além das análises de atividade enzimática e cor (método instrumental) semanalmente, durante o período de um mês. Os resultados foram comparados ao da água de coco não processada e armazenada sob congelamento.

### **3 Material e Métodos**

#### **3.1 Equipamento**

O processamento HUAP foi realizado no equipamento nG7400H:320, fabricado pela Stansted Fluid Power (Stansted, Inglaterra), que atinge pressões de até 320 MPa. O equipamento possui um sistema de dois pistões, que trabalham sincronizados e alternadamente, de forma a manter a pressão de processo estável e contínua durante o processamento.

Um sistema de alimentação composto de duas válvulas foi acoplado antes da entrada do produto no equipamento, permitindo alternar a entrada do produto de dois diferentes recipientes. Um dos recipientes continha água destilada, e o outro água de coco, de forma a permitir o trabalho alternado entre os dois produtos sem a necessidade de pausar o processamento.

Na saída do equipamento, havia um pequeno trocador de calor tubular que trabalhava com água corrente como meio de resfriamento, permitindo a redução da temperatura do produto até cerca de 30°C. Na saída deste trocador, foi acoplada uma serpentina de inox, que foi imersa em banho de gelo, para permitir o resfriamento do produto até cerca de 5°C.

Após a saída da serpentina, o produto entrava em um sistema de enchimento composto por uma válvula de três vias com duas saídas (uma para enchimento e uma para descarte). O sistema de enchimento foi montado dentro de uma cabine de fluxo laminar (esterilizada com o uso de uma lâmpada Ultravioleta) para permitir o envase asséptico do produto.

#### **3.2 Água de Coco**

Os cocos verdes utilizados (*Cocos nucifera*) foram obtidos junto ao CEASA/Campinas nas datas dos ensaios. O estágio de maturação dos frutos não foi controlado.

Os frutos foram lavados em água corrente em um tanque de aço e posteriormente sanitizados em água clorada (5ppm de cloro). Antes da extração da água foram refrigerados (2°C) e então perfurados um a um, utilizando um perfurador manual (Figura 1.1). Após a extração, a água foi filtrada em filtro de café (Melitta 103) para eliminação de partículas maiores (principalmente restos de fibras da casca).

Em seguida, a água foi dividida em três lotes. O primeiro foi envasado em garrafas de vidro e congelado (não processado).

Os outros dois lotes passaram pelo processamento HUAP a 300 MPa, tendo a temperatura de entrada de 10°C. A um dos lotes foi adicionado 15mg de ácido ascórbico para cada 100 mL de água de coco antes do processamento. Este valor foi baseado no estudo de CAMPOS (1996), onde esta quantidade de ácido ascórbico diminuiu a atividade enzimática na água de coco para 0,0% e 0,4% das atividades iniciais de POD e PFO, respectivamente.

### **3.3 Processamento**

O processo era iniciado utilizando água destilada para eliminar o ar do sistema e estabilizar a pressão de processo. Alcançado o regime, e tendo a pressão estabilizada em 300 MPa, o equipamento era alimentado com a água de coco. Utilizando-se o sistema de válvulas instalado na entrada do equipamento, pôde-se alternar a alimentação entre água destilada e água de coco sem necessidade de pausar o processamento. O equipamento permite uma vazão de cerca de 270mL por minuto para o produto.

Após o processamento, o produto foi rapidamente refrigerado até 5°C, utilizando-se o trocador de calor e a serpentina imersa em banho de gelo, de forma a evitar influências da temperatura nos resultados. Após a refrigeração, o produto foi coletado dentro da cabine de fluxo laminar em garrafas de vidro de 450 mL previamente esterilizadas. As amostras, processadas foram armazenadas a 10°C.

As temperaturas do produto foram medidas na entrada (termômetro de mercúrio) e após a válvula de homogeneização, na entrada e na saída do trocador de calor com termopares tipo T acoplados a um aquisitor de dados (Barnat Company – 12 Channel Scanning Thermocouple Thermometer).

### **3.4 Estudo de Estabilidade**

As seguintes análises foram realizadas semanalmente, durante o período de um mês:

#### **3.4.1 Contagem Microbiológica**

As amostras foram analisadas quanto ao número de bolores e leveduras e quanto à contagem total de microrganismos de acordo com os métodos descritos por VANDERZANT (1992) – contagem em superfície em meio PDA (Potato Dextrose Agar) e contagem em profundidade em meio PCA (Plate Count Agar), respectivamente.

#### **3.4.2 Análises Físico-Químicas**

- pH (A.O.A.C. nº 42.1.04 Official Method nº 981.12 (1997));
- Acidez Total Titulável (A.O.A.C. nº 37.1.37 Official Method nº 942.15 (1997))
- Sólidos Solúveis (A.O.A.C. nº 37.1.15 Official Method nº 932.12 (1997));

#### **3.4.3 Atividades Enzimáticas**

As atividades de PFO e POD foram determinadas pelos métodos descritos por PONTING & JOSLYN (1948) e por FEHRMANN & DIAMOND (1967), respectivamente.

Para a PFO, foram misturados em um tubo de ensaio 4,5mL de tampão fosfato pH 6,0 e 1,5mL de catecol, deixando em banho a 25°C até estabilizar a temperatura (aprox. 20 min). Adicionou-se então 2mL de água de coco e foram medidas as mudanças na absorbância a 425nm em intervalos de 1 minuto durante 8 minutos.

Para a POD, foram misturados em um tubo de ensaio 6,0mL de tampão fosfato pH 5,5 e 2,0mL de água de coco, deixando em banho a 35°C até estabilizar a temperatura (aprox. 20 min). Adicionou-se então 1,5mL de guaiacol e 0,5mL de peróxido de hidrogênio e foram medidas as mudanças na absorbância a 470nm em intervalos de 1 minuto durante 8 minutos.

Os valores de pH e temperatura utilizados foram determinados como ótimos para a atividade das duas enzimas presentes na água de coco por CAMPOS (1996).

Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de água de coco capaz de aumentar a absorbância a taxa de 0,001 unidade por minuto. A atividade relativa foi definida como a atividade enzimática do produto processado, dividida pela atividade do mesmo produto não processado.

#### **3.4.4 Cor e Turbidez**

Utilizou-se o espectrofotômetro de cor modelo COLORQUEST II da HunterLab. Utilizou-se o sistema de cor CIELab (Lab), o iluminante D<sub>65</sub>, um ângulo de observação de 10° e uma área de observação de uma polegada quadrada. A cubeta utilizada é de vidro opticamente limpo, sendo determinado nos testes preliminares de leitura de cor o caminho óptico de 2 cm.

#### **3.4.5 Sensorial**

Foram elaborados testes de preferência usando escalas estruturadas. Na verificação das diferenças entre os processos, avaliou-se as amostras nos seguintes aspectos: apreciação global, sabor, cor e intenção de compra. Para os três primeiros aspectos as escalas estruturadas variaram de 1 a 9 (desgostei muitíssimo a gostei muitíssimo), na avaliação da intenção de compra, a escala variou de 1 a 5 (certamente não compraria a certamente compraria). Cada avaliação foi feita por 30 provadores não treinados. (STONE & SIDEL, 1985).



#### 4 Resultados e Discussões

Os resultados das análises microbiológicas (Tabela 4.1) mostraram que o tratamento HUAP foi eficiente na destruição dos microrganismos (bactérias, bolores e leveduras) contaminantes da água de coco. Durante o período de um mês armazenado a 10°C, o número de microrganismos presentes na água de coco processada variou de 0 a 5 UFC/mL, tanto para a contagem total, como para o número de bolores e leveduras.

Há a possibilidade de que os microrganismos sobreviventes estivessem na forma de esporos e, com isso, a temperatura de resfriamento permitiu o controle de sua germinação.

A contagem na água de coco não-processada manteve-se entre  $10^3$  e  $10^4$  UFC/mL durante todo o mês estudado. Neste caso, o número de microrganismos manteve-se controlado devido à temperatura de armazenamento (as amostras não processadas foram mantidas sob congelamento).

**Tabela 4.1 – Resultados das análises microbiológicas dos produtos congelado (CONG), tratado a alta pressão (HUAP) e alta pressão com ácido ascórbico (HUAP+AA)**

Dias	Bolores e Leveduras (UFC/mL)			Contagem Total (UFC/mL)		
	CONG	HUAP	HUAP+AA	CONG	HUAP	HUAP+AA
0	$1,85 \times 10^3$	<1,0	<1,0	$3,90 \times 10^3$	1,5	3,0
15	$6,35 \times 10^3$	2,0	3,0	$5,80 \times 10^3$	2,5	2,5
22	$8,05 \times 10^3$	1,0	3,0	$3,90 \times 10^3$	<1,0	3,0
29	$6,20 \times 10^3$	1,0	1,0	$5,25 \times 10^3$	<1,0	<1,0

As análises físico-químicas também apresentaram variações mínimas durante o período estudado. Os valores de pH, Brix e acidez dos produtos mantiveram-se praticamente constantes durante todo o mês. Além disto, não foram observadas grandes diferenças nas análises realizadas nos produtos processados para o produto não processado pelo método HUAP, indicando que o processamento não altera as propriedades físico-químicas do produto. Os resultados das análises físico-químicas estão apresentados na Figura 4.1.

Como já era esperado, o produto que foi adicionado de ácido ascórbico apresentou valor de pH um pouco menor e de acidez um pouco maior do que os outros dois produtos (que não tiveram ácido ascórbico adicionado).

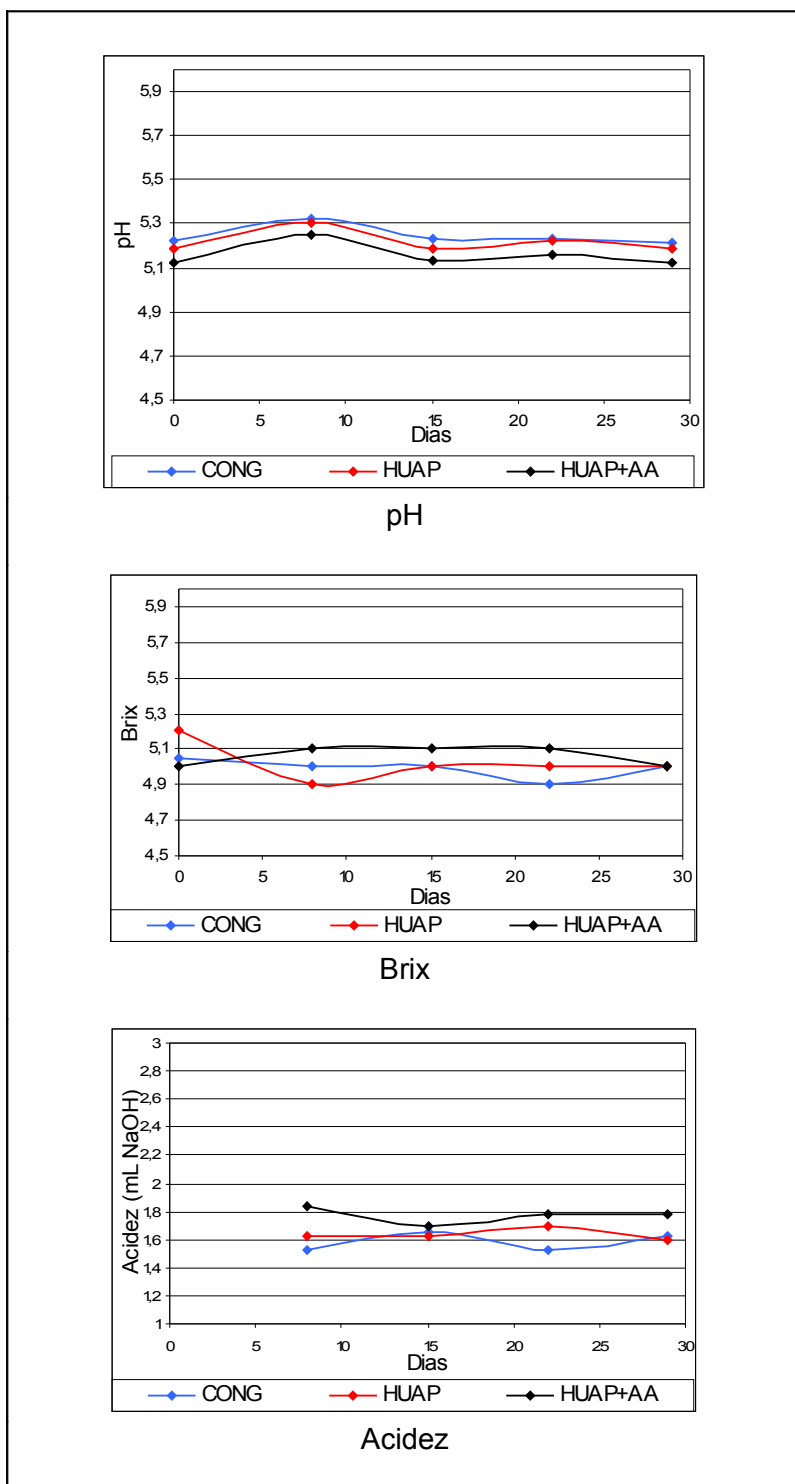
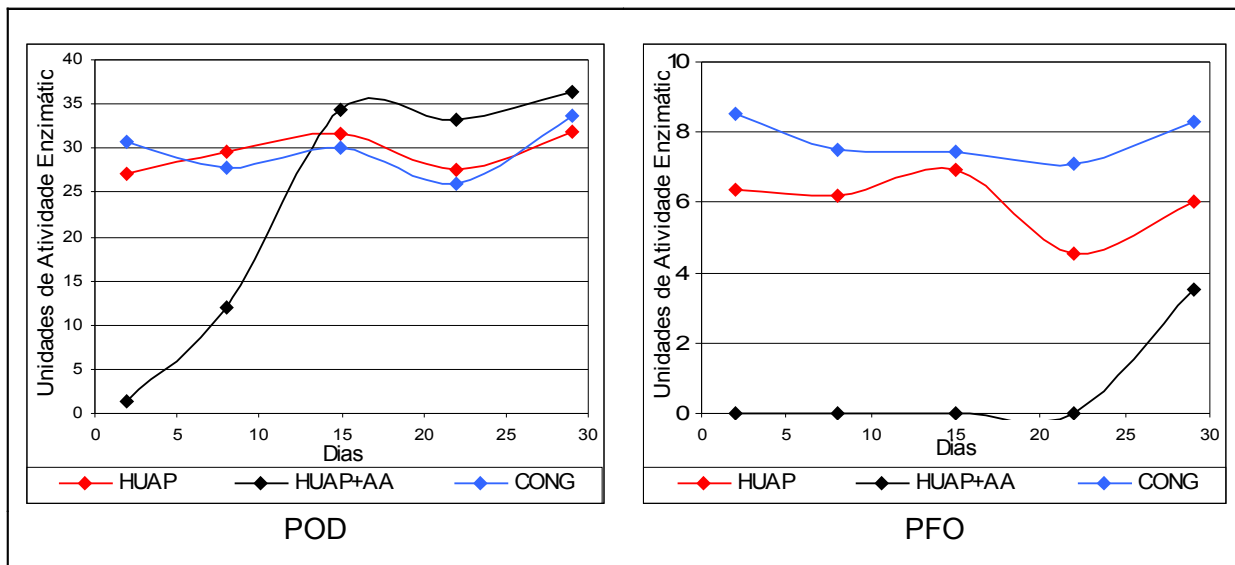


Figura 4.1 – Resultados das análises físico-químicas.

A Figura 4.2 apresenta os resultados obtidos nas análises das atividades de peroxidase e polifenoloxidase.



**Figura 4.2 – Resultados das Análises de Atividades Enzimáticas**

Através das análises da atividade enzimática pode-se observar que o tratamento a alta pressão não foi eficaz na inativação da peroxidase e da polifenoloxidase presentes na água de coco.

O ácido ascórbico mostrou-se eficaz na inativação das enzimas no início do período de armazenamento. Após uma semana, a atividade de peroxidase na amostra com ácido ascórbico alcançou quase metade da atividade das amostras sem aditivos. Após duas semanas, atingiu níveis um pouco superiores ao das amostras sem aditivos, mantendo-se nestes níveis até o final dos experimentos.

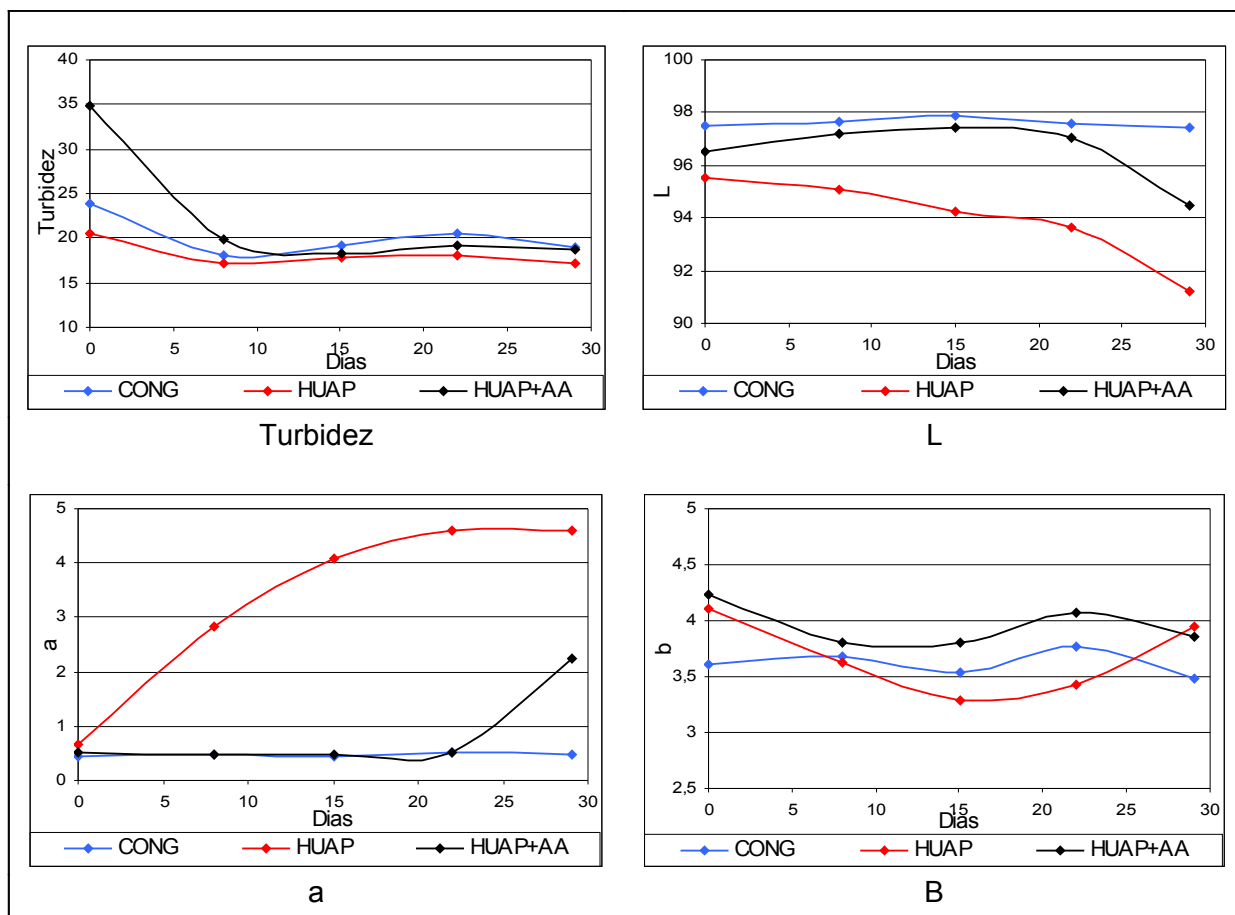
Para a polifenoloxidase, o ácido ascórbico foi mais eficiente, causando a inibição da atividade enzimática durante três semanas de estudos. Na última semana do estudo, um mês após o processamento, a atividade da PFO na amostra com ácido ascórbico aumentou, chegando a níveis próximos aos das amostras não adicionadas do ácido.

A PFO também mostrou-se mais sensível ao tratamento HUAP. Enquanto a amostra tratada apresentou valores bastante próximos ao da água congelada em relação à atividade de POD, nas análises de PFO os valores de atividade foram ligeiramente menores para a amostra tratada quando comparada à congelada.

Os resultados das análises instrumentais de cor e das análises sensoriais dos produtos são apresentados nas Figuras 4.3 e 4.4, respectivamente. Os resultados apresentaram variações durante o período de estocagem diretamente relacionadas com a atividade enzimática presente no produto.

Estas variações foram mais acentuadas na amostra não adicionada de ácido ascórbico que passou pelo tratamento HUAP. As variações dos resultados das análises de cor parecem estar diretamente relacionadas aos valores das atividades enzimáticas das amostras, o que é bastante coerente, já que as enzimas presentes na água de coco estão diretamente relacionadas ao escurecimento de produtos vegetais em geral (VÁMOS-VIGYAZÓ, 1981).

A análise de cor mostrou ainda que o escurecimento enzimático foi controlado pelo ácido ascórbico durante três semanas. Na última análise, realizada um mês após o processamento, a amostra já apresentou uma ligeira alteração em sua coloração, apresentando aumento no valor **a** e diminuição do valor **L**, no sistema CIELab.



**Figura 4.3 – Resultados das Análises Instrumentais de Cor e Turbidez**

As análises sensoriais indicaram alterações nos produtos tratados pelo processamento HUAP. Os produtos apresentaram resultados piores do que o produto mantido sob congelamento para a avaliação de sabor e apreciação global. Durante a estocagem houve uma pequena diminuição da média das notas de sabor para estas duas amostras.

A análise sensorial de cor acompanhou os resultados instrumentais, mostrando a preferência dos consumidores pelos produtos com a cor mais próxima ao produto natural. A amostra com ácido ascórbico apresentou nota reduzida para a análise sensorial de cor apenas na última semana de estudo. A amostra que não continha ácido ascórbico teve notas baixas para cor a partir da segunda análise (realizada uma semana após o processamento).

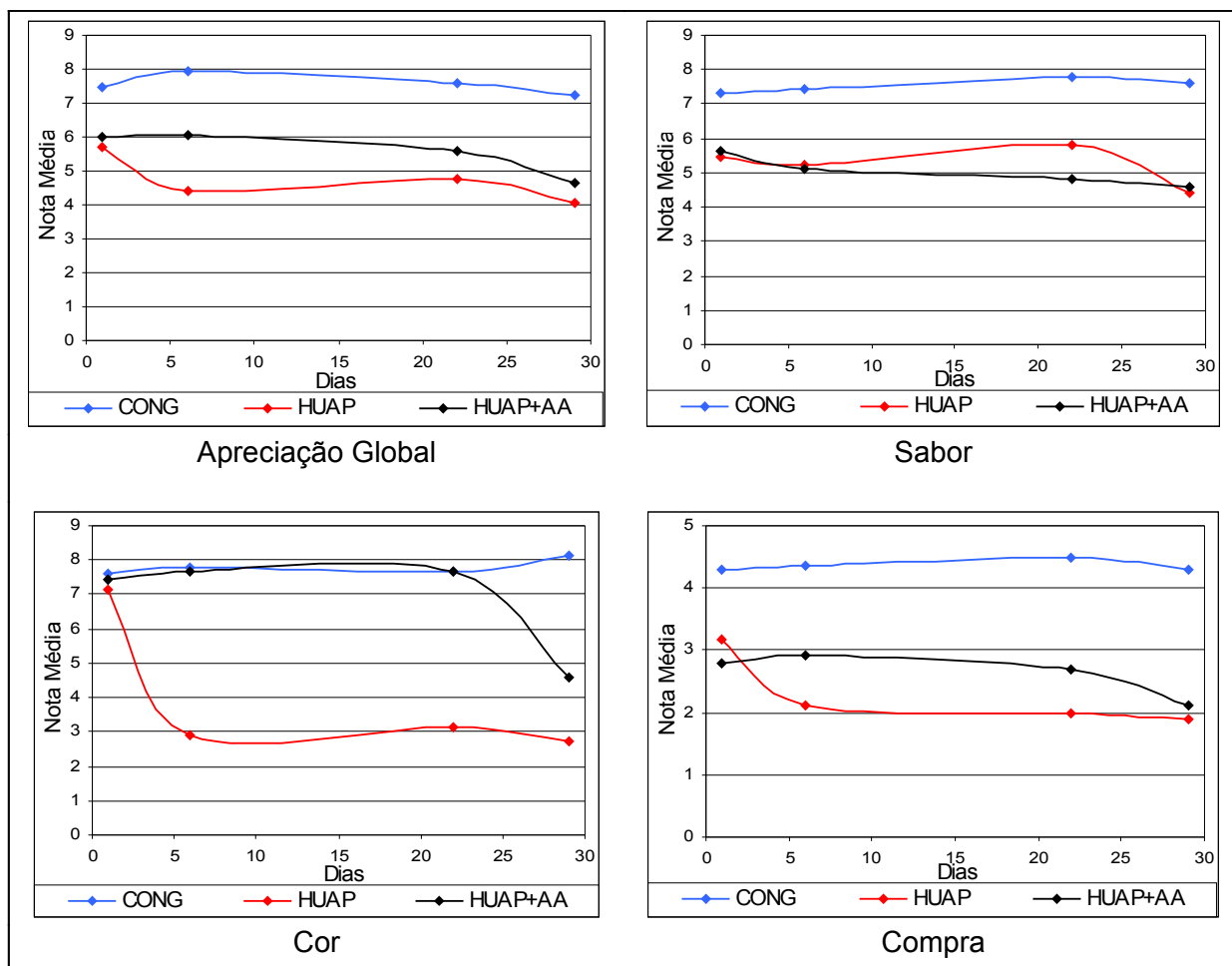


Figura 4.4 – Resultados das Análises Sensoriais

## **5 Conclusões**

O tratamento HUAP aliado à refrigeração (10°C) foi efetivo na estabilização microbiológica da água de coco mas não foi capaz de evitar a atividade enzimática presente no produto.

Os produtos tratados por HUAP também mostraram-se estáveis nas análises físico-químicas, mantendo os valores iniciais de pH, sólidos solúveis e acidez.

O tratamento HUAP combinado com o uso do ácido ascórbico como antioxidante foi eficaz durante 3 semanas. Na quarta semana de estudo, o produto perdeu sua estabilidade, o que causou o seu escurecimento enzimático e diminuiu a aceitação do produto.

O tratamento HUAP somente, sem o auxílio de aditivos químicos não foi eficaz na inativação da POD e foi pouco eficaz na inativação da PFO.

Houve alteração de sabor nos produtos tratados pelo método HUAP em relação ao produto não tratado e congelado logo após sua extração, havendo maior aceitação dos consumidores pelo produto não tratado e mantido sob congelamento.

## 6 Bibliografia

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (A.O.A.C.). **Official methods of analysis**. 16.ed. Gaithersburg , 1997.

BASAK, S.; RAMASWAMY, H.S. Ultra High Pressure treatment of orange juice: a kinetic study on inactivation of pectin methyl esterase. **Food Research Internatonal**, **29**(7):601-607,1996.

BIGNON, J. Cold Pasteurizers Hiperbar for the Stabilization of Fresh Fruit Juices. **Fruit Processing**, **6**(2):46-48,1997.

CAMPOS, C.F.; SOUZA, P.E.A., COELHO, J.V.; GLORIA, M.B.A. Chemical Composition, Enzyme Activity and Effect of Enzyme Inactivation on Flavor Quality of Green Coconut Water **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 20, n 26, p. 487-500, 1996

FERHRMANN, W.L.; DIAMOND, A.E. Peroxidase activity and phytopora resistance in different organs of potato plant. **Phytopatology**, v. 57, p. 69-72, 1967.

GOULD, G.W. Methods for preservation and extension of shelf life. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 33, n. 1, p. 51-64, 1996. Elsevier Science

PONTING, J.D.; JOSLYN, M.A. Ascorbic Acid Oxidation and browning in apple tissue extracts. **Arch. Biochem.**, v. 19, p.47-63, 1948.

POPPER, L; KNORR, D. Application of High-Pressure Homogenization for Food Preservation **Food Technology**, **43**(7):86-90, 1990.

STONE, S. M.; SIDEL, J. **Sensory Evaluation Practices**. London: Academy Press, 1985. 311p.



VÁMOS-VIGYAZÓ, L. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 1981.

VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D.F. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3 ed. Washington: American Public Health Association, 1992. 1219 p.

## CONCLUSÕES GERAIS

De maneira geral conclui-se que o tratamento de homogeneização a alta pressão apresentou, para as faixas de pH (4,5 a 6,0) e pressão (100 a 300 MPa) estudadas, alta eficiência na eliminação de bactérias (*Lactobacillus fructivorans*) e leveduras (*Saccaromyces cerevisiae*) e pouca ou nenhuma eficiência na inativação das enzimas presentes no produto (peroxidase e polifenoloxidase).

Embora os tratamentos nas pressões estudadas não tenham sido suficientes para inativar as enzimas da água de coco, os resultados indicam que a utilização de tratamentos em pressões mais elevadas possa inativar satisfatoriamente as enzimas. Não foi verificada potencialização do efeito de inativação pelo uso de tratamentos múltiplos e, de modo geral, a POD apresentou maior resistência ao tratamento HUAP do que a PFO.

A aplicação do tratamento em pressões maiores do que 250 MPa é capaz de promover mais de sete reduções logarítmicas no número de células de *Lactobacillus fructivorans* em água de coco. O pH exerce uma influência muito menor do que a pressão de processo na destruição dos *Lactobacillus fructivorans*. Em altas pressões (próximas a 300 MPa), o processamento mostrou-se mais efetivo na destruição dos microrganismos quando utilizado em produtos com pH mais elevado. Para pressões baixas, o efeito é inverso (pHs menores permitem maior efetividade do processamento).

Tratamentos em pressões superiores a 200 MPa são capazes de eliminar níveis de até  $10^5$  UFC/mL de *Saccaromyces cerevisiae* presentes na água de coco, independentemente do pH do produto (dentro da faixa estudada, de 4,5 a 6,0). O pH parece ter efeito na morte das leveduras quando o tratamento é realizado a pressões mais baixas. Este efeito não pôde ser avaliado pelos estudos realizados.

O tratamento HUAP não foi suficiente para estabilizar o produto para armazenagem em temperatura de resfriamento. Embora o produto tratado apresentasse boa estabilidade nesta temperatura em relação aos aspectos de contaminação microbiológica, a presença de enzimas no produto, mesmo depois do tratamento HUAP causou alterações sensoriais e de cor na água de coco.

Para continuidade das pesquisas a respeito do processamento de homogeneização a alta pressão, sugere-se os seguintes estudos:

- Uso de tecnologias combinadas (pressão aliada à temperatura ou a agentes químicos) para estudos de inativação das duas enzimas.
- Uso de pressões mais elevadas para estudos de inativação das duas enzimas.
- Uso de pressões mais baixas e contaminação inicial mais elevada para estudo da influência do pH na destruição das células de *Saccaromyces cerevisiae*.
- Aplicação do tratamento a outros produtos e estudo de inativação de outras enzimas e microrganismos relacionados a estes.

## BIBLIOGRAFIA

ANESE, M.; NICOLI, M.C.; DALL'AGLIO, G.; LERICI, C.R. Effect of high pressure treatments on peroxidase and polyphenoloxidase activities **Journal of Food Biochemistry**; v. 18, n. 4, p. 285-293, 1995.

ASAKA, M.; HAYASHI, R. Activation of Polyphenoloxidase in Pear Fruits by High Pressure Treatment **Agriculture Biology Chemistry**, v. 55, n. 9, p. 2439-2440, 1991.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (A.O.A.C.). **Official methods of analysis**. 16.ed. Gaithersburg , 1997.

BARBOSA-CÁNOVAS, G.V.; POTHAKAMURY, U.R.; PALOU, E.; SWANSON, B.G. Nonthermal Preservation of Foods, 276p., Marcel Dekker Inc., New York, 1998.

BASAK, S.; RAMASWAMY, H.S. Ultra High Pressure treatment of orange juice: a kinetic study on inactivation of pectin methyl esterase. **Food Research Internatonal**, **29**(7):601-607,1996.

BERGONIA, H.A.; PAPA, G.M.; FABILITANTE, J.R.; DEL ROSARIO, E.J. Reverse osmosis of coconut water through cellulose membrane **Philippines Journal of Food Science and Technology**, v. 6, n. 1-2, p. 31-40, 1982.

BIGNON, J. Cold Pasteurizers Hiperbar for the Stabilization of Fresh Fruit Juices. **Fruit Processing**, **6**(2):46-48,1997.

BRUNS, R.E.; BARROS NETO, B.; SCARMINIO, J.S. **Planejamento e Otimização de Experimentos**. 2.ed. Campinas: Editora da Unicamp, 1995. 299 p.

CAMPOS, C.F.; SOUZA, P.E.A., COELHO, J.V.; GLORIA, M.B.A. Chemical Composition, Enzyme Activity and Effect of Enzyme Inactivation on Flavor Quality of Green Coconut Water **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 20, n 26, p. 487-500, 1996.

CANO, M.P.; HERNÁNDEZ, A. DE ANCOS, B. High pressure and temperature effects on enzyme inactivation in strawberry and orange products **Journal of Food Science**, v. 62, n. 1, p. 85-88, 1997.

CHEFTEL, J.C. Review: High-pressure, microbial inactivation and food preservation **Food Science and Technology International**, 1(2/3):75-90, 1995.

DEL ROSARIO, E.J.; PAPA, G.M.; BERGONIA, H.A.; REYES, C.S. Concentration of coconut water by plate and frame reverse osmosis using cellulose acetate membrane **Asean Food Journal**, v. 2, n. 1, p. 19-24, 1986.

FERHRMANN, W.L.; DIAMOND, A.E. Peroxidase activity and phytopora resistance in different organs of potato plant. **Phytopatology**, v. 57, p. 69-72, 1967.

GOULD, G.W. Methods for preservation and extension of shelf life. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 33, n. 1, p. 51-64, 1996. Elsevier Science

GUERRERO-BELTRÁN, J.A.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V.; SWANSON, B.G. High Hydrostatic Pressure Processing of Fruit and Vegetable Products **Food Reviews International**, v. 21, n. 4, p. 411-425, 2005a.

GUERRERO-BELTRÁN, J.A.; SWANSON, B.G.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V., Shelf life of HHP-Processed peach puree with antibrowning agents **Journal of Food Quality**, v. 28, n. 5-6, p. 479-491, 2005b.

GUERRERO-BELTRÁN, J.A.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V.; MORAGA-BALLESTEROS, G.; MORAGA-BALLESTEROS, M.J.; SWANSON, B.G., Effect of pH and ascorbic acid on high

hydrostatic pressure processed mango puree **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 30, n. 5, p. 582-596, 2006.

HASHIZUME, C.; KIMURA, K.; HAYASHI, R. Kinetic Analysis of Yeast Inactivation by High Pressure Treatment at Low Temperatures. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 59, n. 8, p. 1455-1458, 1995.

HAYES, M.G.; KELLY, A.L. High pressure homogenization of milk (b) effects on indigenous enzymatic activity **Journal of Dairy Research** v.70, n. 3, p. 307-313, 2003.

HENDRICKX, M.; LUDIKUYZE, L.; VAN den BROECK, I.; WEEMAES, C. Effects of high pressure on enzymes related to food quality **Trends in Food Science and Technology**, v. 9, n. 5, p. 197-203, 1998.

HOOVER, D.G.; METRICK, C.; PAPINEAU, A.M.; KNORR, D. Biological Effects of High Hydrostatic Pressure on Food Microorganisms. **Food Technology**, 43(3):99-107, 1989.

KLEINIG, A.R.; MIDDLEBERG, A.P.J. On the mechanism of microbial cell disruption in high-pressure homogenisation **Chemical Engineering Science AIChE Journal**, v. 53, n. 5, p. 891-898, 1998.

LEE, S.Y.; DOUGHERTY, R.H.; KANG, D.H. Inhibitory Effects of High Pressure and Heat on Alicyclobacillus acidoterrestris Spores in Apple Juice **Applied and Environmental Microbiology** v. 68, n. 8, p. 4158-4161, 2002.

LOPEZ-MALO, A.; PALOU, E.; BARBOSA-CANOVAS, G.V.; WELTI-CHANES, J.; SWANSON, B. Polyphenoloxidase activity and color changes during storage of high hydrostatic pressure treated avocado puree **Food Research International**, v. 31, n. 8, p. 549-556, 1998.

MAGDA, R.R. Coco soft drink: Health beverage from coconut water **Food Marketing and Technology**, v. 6, n. 6, p. 22-23, 1992.

MERMELSTEIN, N.H. (ed.) High-Pressure Pasteurization of Juice. **Food Technology**, Chicago, v. 53, n. 4, p. 86-90, Apr, 1999.

OGAWA, H.; FUKUHISA, K.; KUBO, Y.; FUKUMOTO, H. Pressure Inactivation of Yeasts, Molds, and Pectinesterase in Satsuma Mandarin Juice: Effects of Juice Concentration, pH, and Organic Acids, and Comparison with Heat Sanitation. **Agriculture Biology Chemistry** vol. 54, n. 5, p. 1219-1225, 1990.

PARISH, M.E. High Pressure Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae*, endogenous microflora and pectinmethylesterase in orange juice. **Journal of Food Safety**, **18**(1):57-65, 1998.

PLAZA, L.; MUÑOZ, M.; de ANCOS, B.; CANO, M.C. Effect of combined treatments of high-pressure, citric acid and sodium chloride on quality parameters of tomato puree **European Food Research and Technology**, v. 216, n. 6, p. 514-519, 2003.

PONTING, J.D.; JOSLYN, M.A. Ascorbic Acid Oxidation and browning in apple tissue extracts. **Arch. Biochem.**, v. 19, p.47-63, 1948.

POPPER, L; KNORR, D. Application of High-Pressure Homogenization for Food Preservation **Food Technology**, **43**(7):86-90, 1990.

QUAGLIA, G.B.; GRAVINA, R.; PAPERI, R.; PAOLETTI, F. Effect of High Pressure Treatments on Peroxidase Activity, Ascorbic Acid Content and Texture in Green Peas **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, v. 29, n. 5/6, p. 552-555, 1996.

REDDY, K.V.; DAS, M.; DAS, S.K. Filtration resistances in non-thermal sterilization of green coconut water **Journal of Food Engineering**, v. 69, n. 3, p. 381-385, 2005.

SEYDERHELM, I.; BOGUSLAWSKI, S.; MICHAELIS, G.; KNORR, D. Pressure induced inactivation of selected enzymes **Journal of Food Science**, v. 61, n. 2, p. 308-310, 1996.

SMELT, J.P.P. Recent advances in the microbiology of high pressure processing. **Trends in Food Science & Technology**, Oxford, v. 9, n: 4, p. 152-158, 1998.

VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D.F. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3 ed. Washington: American Public Health Association, 1992. 1219 p.

WEEMAES, C.; LUDIKHUYZE, L.; BROECK, I. VAN DEN; HENDRICKX, M. High Pressure Inactivation of Polyphenoloxidases **Journal of Food Science**, v. 63, n. 5, p. 873-877, 1998.

WUYTACK, E.Y.; DIELS, A.M.J.; MICHIELS, C.W. Bacterial inactivation by high-pressure homogenisation and high hydrostatic pressure **International Journal of Food Microbiology**, v. 77, n.3, p. 205-212, 2002.